

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Michael Stöckle

Die Wirkung der modifizierten Zoledronsäure auf 3D-Prostatakarzinomsphäroide

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von: Johannes Kurt Schmidt

geb. am: 27.06.1988 in Neunkirchen (Saar)

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 4 |
| 1. Zusammenfassung/Summary..... | 8 |
| 2. Einleitung..... | 12 |
| 2.1 Das Prostatakarzinom | 12 |
| 2.1.1 Epidemiologie | 12 |
| 2.1.2 Ätiologie..... | 12 |
| 2.1.3 Diagnostik | 13 |
| 2.1.4 Klassifikation nach UICC | 15 |
| 2.1.5 Therapie..... | 19 |
| 2.2 Bisphosphonate..... | 23 |
| 2.3 Nanotechnologie | 28 |
| 2.4 Tumormicroenvironment..... | 31 |
| 2.5 Ziele der Arbeit..... | 35 |
| 3. Material und Methodik | 36 |
| 3.1 Zellkulturbedarf | 36 |
| 3.2 Geräte..... | 37 |
| 3.3 Zellkultur | 37 |
| 3.3.1 Zelllinien | 37 |
| 3.3.2 Mediumwechsel bei adhärenen Zellen | 39 |
| 3.3.3 Passagieren von adhärenen Zellen | 39 |
| 3.3.4 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer | 40 |
| 3.3.5 Herstellung von hitzeinaktiviertem FCS | 40 |
| 3.4 Zellkulturassays an Monolayer-Kulturen | 40 |
| 3.5 Sphäroide | 45 |
| 3.5.1 Beschichten von 96 Well Mikrotiterplatten mit 2%iger Agarose | 46 |
| 3.5.2 Kultivierung von Sphäroiden in 96 Well Mikrotiterplatten | 46 |
| 3.5.3 Zellkulturassays an 3D-Sphäroidkulturen | 47 |
| 3.6 Herstellung der Zoledronsäuremodifikationen | 49 |
| 4. Ergebnisse | 52 |
| 4.1 Ergebnisse 2D-Monolayer | 52 |
| 4.1.1 Prostatakarzinomzellen | 52 |
| 4.1.2 Tumorassoziierte Fibroblasten | 62 |
| 4.2 Ergebnisse Sphäroide | 67 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.2.1 | Homosphäroide | 67 |
| 4.2.2 | Heterosphäroide | 78 |
| 5. | Diskussion | 82 |
| 5.1 | Zweidimensionale Zellkultur..... | 82 |
| 5.1.1 | Prostatakarzinomzellen | 82 |
| 5.1.2 | Fibroblasten | 89 |
| 5.2 | Dreidimensionale Zellkultur..... | 92 |
| 5.2.1 | Homosphäroide | 92 |
| 5.2.2 | Heterosphäroide | 95 |
| 5.3 | Probleme und Grenzen der Nanotechnologie | 103 |
| 5.4 | Probleme und Grenzen der Sphäroidtechnologie | 105 |
| 5.5 | Schlussfolgerungen und Ausblick | 108 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 110 |
| 7. | Publikationen/Dank | 135 |
| 7.1 | Publikationen | 135 |
| 7.2 | Posterpräsentationen und Vorträge..... | 135 |
| 7.3 | Dank..... | 136 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| 2D | Zweidimensional |
| 3D | Dreidimensional |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ADPCAF | Androgen dependant prostate cancer associated fibroblasts |
| ADT | Androgen deprivation therapy |
| AFFIRM-Studie | Randomisierte Phase III-Studie über die Wirkung von Enzalutamid im metastasierten CRPC |
| Akt/PKB | Proteinkinase B |
| AnxA1 | Annexin A1 |
| APH-Assay | Acid phosphatase-Assay |
| AppCp | Adenosine-5'-[(β,γ)-methyleno]triphosphate |
| ApppI | Triphosphoric acid 1-adenosin-5'-yl ester 3-(3-methylbut-3-enyl) ester |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bax | Bcl-2-associated X protein/Bcl-2-like protein 4 |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2, Protein zur Regulation von Apoptose |
| bFGF | Basic fibroblast growth factor |
| BIRC3 | Baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat containing 3 |
| BMP | Bone morphogenetic protein |
| BrdU | 5-Brom-2'-Desoxyuridin, BrdU ELISA colorimetric |
| CAF | Cancer associated fibroblast |
| CaPZ NPs | Zoledronsäure-encapsulierende Nanopartikel auf Calciumphosphatbasis |
| CDD ⁺ | Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} |
| cDNA | Complementary desoxyribonucleic acid |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CRPC | Castration-resistant prostate cancer |
| CRPCAF | Castration-resistant prostate cancer associated fibroblasts |
| CRPCSC | Castration-resistant prostate cancer stem cells |
| CT | Computertomographie |
| CXCL12 | CXC-Motiv-Chemokin 12 |
| CXCR4 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 |

| | |
|------------------|---|
| CYR61 | Cysteine-rich angiogenic inducer 61 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| DRU | Digitale rektale Untersuchung |
| ECM | Extracellular Matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMT | Epithelial-mesenchymale Transition |
| ERK | Extracellular-signal regulated kinase |
| ERSPC | European randomized study of screening for prostate cancer |
| FCM | Flow cytometry |
| FCS | Fetal calf serum |
| FDA | Food and drug administration |
| FPP | Farnesylpyrophosphat |
| FPPS | Farnesylpyrophosphat Synthase |
| GDF15 | Growth/differentiation factor 15 |
| GGPP | Geranylgeranylpyrophosphat |
| GGPPS | Geranylgeranylpyrophosphat Synthase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GTPase/G-Protein | GTP-bindendes Protein |
| HER2 | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| HFFF2 | Human fetal foreskin fibroblasts 2 |
| HGF | Human gingival fibroblasts |
| hi-FCS | Hitzeinaktiviertes FCS |
| IC50 | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| IL-10 | Interleukin-10 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IPP | Isopentenylpyrophosphat |
| K | Biologische Kontrolle |
| LCaP_NPs | Liposomale, Zoledronsäure-freie Kontrollnanopartikel auf Calciumphosphatbasis |
| LCaPZ NPs | Liposomale, Zoledronsäure-inkapsulierende Nanopartikel auf Calciumphosphatbasis |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LDH ⁺ | Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} |

| | |
|-----------------|---|
| LHRH | Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon |
| LipoZOL | In stealth liposomes verpackte Zoledronsäure |
| MAPK/MAP-Kinase | Mitogen activated protein kinase |
| MEK/MAP2K/MAPKK | Mitogen-activated protein kinase kinase |
| miRNA | Micro-RNA |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MPS | Mononukleäres Phagozytensystem |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| m-TOR | Mechanistic target of Rapamycin |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrid |
| NADPH | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Hydrid |
| NEA | Non essential amino acids |
| NF- κ B | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NGS | Next generation sequencing |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PET | Positronenemissionstomographie |
| PI3K | Phosphoinositid 3 Kinase |
| PKB | Proteinkinase B |
| PLCaP_NPs | Pegylierte, Zoledronsäure-freie Kontrollnanopartikel auf Calciumphosphatbasis |
| PLCaPZ NPs | Pegylierte, Zoledronsäure-inkapsulierende Nanopartikel auf Calciumphosphatbasis |
| PLCO | Prostate, lung, colorectal, ovarian cancer |
| PNF | Tumorassoziierte Fibroblasten aus der tumorfreien Region |
| PP _i | Anorganisches Pyrophosphat |
| PREFERE-Studie | Deutsche, multizentrische, randomisierte Studie für Patienten mit Prostatakarzinom |
| Pre-PLCaPZ NPs | Über ein bestimmtes Herstellungsverfahren generierte PLCaPZ NPs |
| PREVAIL-Studie | Randomisierte, doppelblinde Phase III-Studie über die Wirkung von Enzalutamid im metastasierten CRPC ohne vorherige Chemotherapie |
| PSA | Prostataspezifisches Antigen |
| PTF | Tumorassoziierte Fibroblasten aus der tumortragenden Region |
| Rac | Unterfamilie von G-Proteinen der Rho-Familie |

| | |
|-------------|---|
| Raf-1/C-RAF | Cellular rapidly accelerated fibrosarcoma, Serin/Threonin-Proteinkinase |
| RANK | Receptor activator for nuclear factor κ B |
| RANKL | Receptor activator for nuclear factor κ B Ligand |
| Ras | Rat Sarcoma, Proto-Onkogen, das für ein G-Protein kodiert |
| RES | Retikuloendotheliales System |
| Rho | Ras homologue, kleines G-Protein |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT-PCR | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| S3 | Leitlinie mit allen Elementen einer systematischen Entwicklung |
| siRNA | Small interfering-RNA |
| Stat3 | Signal transducer and activator of transcription 3 |
| TAMs | Tumor associated macrophages |
| TGF β | Transforming growth factor beta |
| TNM | Tumor node metastasis |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TRUS | Transrektaler Ultraschall |
| UICC | Union internationale contre le cancer |
| USPSTF | US preventive services task force |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| WST-1 | Cell Proliferation Reagent WST-1 |
| ZOL | Zoledronsäure |
| μ FCM | Micro flow cytometry |

1. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland. Insbesondere für Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom ist das Angebot an therapeutischen Möglichkeiten begrenzt und die Wirkung der zur Verfügung stehenden Medikamente unzureichend. Ein fester Bestandteil der Therapie dieses Krankheitsstadiums ist die Behandlung und Prävention skelettbezogener Komplikationen mit Bisphosphonaten, deren potentester Vertreter die Zoledronsäure, ein Aminobisphosphonat der dritten Generation, ist. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Zoledronsäure nicht nur osteoprotektiv, sondern direkt zytotoxisch gegen Prostatakarzinomzellen *in vitro* wirkt. Dieser für Monolayerkulturen von Prostatakarzinomzellen beobachtete antitumorale Effekt konnte jedoch *in vivo* unter Verwendung von Mausmodellen nicht bzw. nur in abgeschwächter Form reproduziert werden. Ein möglicher Grund für die geringere Effektivität der Zoledronsäure *in vivo* ist ihre Pharmakokinetik, die durch eine kurze Plasmahalbwertszeit und eine hohe Affinität zum knöchernen Gewebe mit dortiger Akkumulation gekennzeichnet ist. Hierdurch ist ihre Bioverfügbarkeit im extraskelletalen Gewebe begrenzt. Der Einsatz der Nanotechnologie in der Entwicklung neuer Pharmaka stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, die Pharmakokinetik von Medikamenten zu verändern und dadurch ihre Bioverfügbarkeit im Primärtumorgewebe zu steigern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch ein Verpacken der freien Zoledronsäure in zwei unterschiedliche Nanovektoren ihre antitumorale Potenz gegenüber Monolayerkulturen von Prostatakarzinomzellen gesteigert werden kann. Als grundlegender Wirkmechanismus konnte hierbei in erster Linie eine Inhibition der Zellproliferation eruiert werden, die vor allem durch die Enkapsulierung der freien Zoledronsäure in pegylierte Nanopartikel zusätzlich verstärkt wird. Da zweidimensionale Zellkultursysteme nicht in der Lage sind, die dreidimensionale Organarchitektur und die biologische Situation *in vivo* realitätsnah nachzubilden, wurde in einem nächsten Schritt ein dreidimensionales Zellkultursystem etabliert, um den Effekt der verwendeten Zoledronsäuremodifikationen *in vitro* zu untersuchen. Als multizelluläre, dreidimensionale Zellaggregate dienten Prostatakarzinomsphäroide, welche unter Verwendung eines etablierten Protokolls in hoher Stückzahl auf mit Agarose beschichteten 96 Well Mikrotiterplatten generiert wurden. Ausgewertet wurden die Experimente mit an die Bedürfnisse der 3D-Kultur angepassten Standard-Zellkulturassays.

Um die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und tumorassoziierten Fibroblasten innerhalb des Tumormicroenvironments der Prostata zu simulieren und den Effekt dieser Interaktionen auf die Wirksamkeit der verwendeten Zoledronsäuremodifikationen zu untersuchen, wurden neben Homosphäroiden auch Heterosphäroide aus Prostatakarzinomzellen und Fibroblasten mit den entsprechenden Nanovektoren inkubiert. Die bereits im zweidimensionalen Zellkultursystem beobachtete Wirkungssteigerung der freien Zoledronsäure durch Enkapsulierung in besagte Nanovektoren konnte in abgeschwächter Form auch für die Sphäroidkultur nachgewiesen werden, mit der schwächsten Wirkung in den Heterosphäroiden. Auch im dreidimensionalen Zellkultursystem wurde als grundlegender Wirkmechanismus eine Inhibition der Zellproliferation beobachtet. Obwohl die verwendeten Fibroblasten allein als Monolayer kultiviert äußerst empfindlich auf bereits niedrige Zoledronsäurekonzentrationen reagierten, führten sie bei Verwendung der vierfachen Konzentration im dreidimensionalen Verband der Heterosphäroide zu einer gesteigerten Chemotherapeutikaresistenz der Prostatakarzinomsphäroide. Dies unterstreicht die Relevanz der Wechselwirkungen innerhalb des Tumormicroenvironments für die Therapie des Prostatakarzinoms und bösartiger Erkrankungen allgemein. Obgleich weitere Studien nötig sind, um valide Aussagen treffen zu können, geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Grund zu der Annahme, dass das Verpacken der freien Zoledronsäure in die verwendeten Nanopartikel eine potente Möglichkeit darstellt, ihre Bioverfügbarkeit und somit ihre zytotoxische Wirkung im Primärtumorgewebe der Prostata zu steigern, wodurch neue therapeutische Strategien in der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms erschlossen werden könnten.

1. Summary

The effect of encapsulated zoledronic acid on 3D-prostate carcinoma spheroids

Prostate cancer is the most common malignancy and the third most frequent reason for cancer related death in German men. Particularly in patients with castration-resistant prostate cancer, therapeutic options are limited and the effect of established drugs is insufficient. One crucial treatment method in this stage of disease is the treatment and prevention of skeletal related events with bisphosphonates. Zoledronic acid, a third generation aminobisphosphonate, is the most potent representative among all bisphosphonates. Several studies have shown that zoledronic acid exerts - beyond its osteoprotective potential - direct cytotoxic effects on prostate carcinoma cells in vitro. However, this direct anti-tumor activity against monolayer cultures of prostate carcinoma cell lines in vitro couldn't be reproduced at all or only to a far smaller degree using in vivo mouse models. One reason for the reduced effectiveness of zoledronic acid against prostate cancer cells in vivo might be its pharmacokinetic profile, which is characterized by a short plasma half time and a high affinity to the skeletal tissue with consecutive accumulation. Consequently, its bioavailability in the extra-skeletal tissue representing the origin of prostate cancer is limited. The use of nanotechnology in the generation of new pharmaceuticals represents a promising approach to modify the pharmacokinetics of drugs in order to increase their bioavailability in the primary tumor tissue.

In the context of this work was shown, that the anti-tumor activity of free zoledronic acid can be increased by its encapsulation in two different nanocarriers using a two-dimensional cell culture system. An inhibition of cell proliferation, which was enhanced especially by the encapsulation of zoledronic acid in pegylated nanoparticles, was identified as the main underlying mechanism of action. Since monolayer cultures are neither able to mimic the organic architecture of the prostate nor the biological situation in vivo, a three-dimensional cell culture system was established in a second step to investigate the effect of the applied substances in vitro. As multi-cellular, three-dimensional aggregates of cells served spheroids of prostate cancer cells, which were generated in a high number on agarose gel coated 96 well microtiterplates using a standard protocol. Experiments were analyzed using standard cell culture assays adapted to the spheroid-culture.

To take the diverse interactions between tumor cells and tumor associated fibroblasts within the tumor microenvironment of the prostate into consideration and to investigate the effect of such interactions on the effectiveness of the zoledronic acid modifications, homospheroids

were incubated with the different nanovectors as well as heterospheroids containing additionally cancer associated fibroblasts.

In analogy to the two-dimensional cell culture system, the nanomodification of free zoledronic acid resulted in an enhanced antitumor activity within spheroids, even though to a lesser degree with the smallest effect in heterospheroids. As already described for the two-dimensional cell culture system, an inhibition of cell proliferation was observed as the main mechanism of action. Although fibroblasts cultivated alone as monolayers reacted very sensitive to low concentrations of zoledronic acid, they increased the resistance of the prostate cancer spheroids against the applied chemotherapeutics in the heterospheroids when using fourfold substance concentrations. This underlines the relevance of the interactions within the tumor microenvironment for the therapy of prostate cancer and malignant diseases generally.

Although additional studies are necessary to provide further evidence, there is reason to believe that the encapsulation of free zoledronic acid into the different nanovectors could represent a promising approach to increase its bioavailability and thus its cytotoxicity in the primary tumor tissue of the prostate gland, enabling the development of new therapeutic strategies for castration-resistant prostate cancer.

2. Einleitung

2.1 Das Prostatakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist mit 26% die häufigste maligne Erkrankung und mit 10% die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland. (Kraywinkel K et al., 2012) Wie in den meisten westlichen Industrienationen ist in den letzten Jahren die Zahl der Neuerkrankungen auch in Deutschland kontinuierlich gestiegen und wird für das Jahr 2014 auf 70100 geschätzt. Obwohl vor allem durch den verstärkten Einsatz des prostataspezifischen Antigen (PSA)-Screenings viele Prostatakarzinome immer früher diagnostiziert werden, handelt es sich weiterhin um eine typische Erkrankung des älteren Mannes mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren. (Kaatsch P et al., 2013)

Basierend auf der 13. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des statistischen Bundesamtes, welche von einer annähernden Verdopplung des Anteils der über 65-jährigen bis zum Jahr 2060 ausgeht, ist mit einer erheblichen Zunahme der absoluten Zahl an Prostatakarzinomerkrankungen innerhalb der nächsten Jahrzehnte zu rechnen. Aufgrund dieser Entwicklung wird das Management des Prostatakarzinoms in Zukunft noch mehr an gesundheitsökonomischer Bedeutung gewinnen.

2.1.2 Ätiologie

Das Prostatakarzinom stellt eine multifaktoriell bedingte Erkrankung dar, deren Ätiologie noch nicht vollends geklärt ist. (Adjakly M et al., 2015)

Zahlreiche Studien konnten jedoch belegen, dass insbesondere drei Risikofaktoren mit der Entstehung dieser Erkrankung in Verbindung stehen. Hierzu gehören eine positive Familienanamnese (Woolf CM, 1960; Meikle AW et al., 1985; Steinberg GD et al., 1990), die Ethnie (Haas GP et al, 1997; Paris PL et al., 1999; Gann PH, 2002; Kheirandish P et al., 2011; Romero FR et al., 2012) und das Lebensalter (Aus G et al, 2005; Forbat L et al., 2013). Experten stimmen darin überein, dass der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms das Alter ist.

Diesen drei Faktoren gemeinsam ist, dass sie nicht beeinflussbar sind. Ihnen gegenübergestellt werden durch den Lebensstil modifizierbare Faktoren, denen ein protektiver Effekt nachgesagt wird. Hierzu gehören eine ballaststoffreiche und fettarme Ernährung mit

eingeschränkter Zufuhr von Calcium und ausreichender Aufnahme von Vitamin D, Alkohol- und Nikotinkarenz sowie ausreichende körperliche Betätigung mit Reduktion von Übergewicht. (Cuzick J et al., 2014) Derzeit gibt es jedoch keine Studie, die den protektiven Nutzen eines dieser Faktoren belegt, so dass bezüglich dieser Maßnahmen kein Konsens herrscht. (Tao Z-Q et al., 2015)

Die Tatsache, dass Eunuchen, also Männer, die vor der Pubertät kastriert wurden, nicht an Prostatakrebs erkranken, beweist, dass für die Entstehung und das Wachstum des Prostatakarzinoms zumindest initial Androgene notwendig sind. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Konzentration des Serumtestosterons und dem Risiko für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms. (Morote J et al., 2009)

2.1.3 Diagnostik

Frühe Krankheitsstadien verursachen meist keine klinischen Symptome. Selbst fortgeschrittene Stadien können lange Zeit asymptomatisch bleiben. Beschwerden werden häufig erst durch die Metastasen des Prostatakarzinoms verursacht. Da bei fortgeschrittener, metastasierter Erkrankung keine kurative Therapie mehr möglich ist, ist für die Früherkennung die regelmäßige Durchführung von Vorsorgeuntersuchungen unerlässlich. Zu den diagnostischen Standards gehört die digitale rektale Untersuchung (DRU), die bei Fehlen von Risikofaktoren ab einem Alter von 45 Jahren einmal jährlich durchgeführt werden sollte. Aufgrund der räumlichen Nähe der peripheren Zone der Prostata, in welcher 90% der Prostatakarzinome entstehen, zum Rektum, können Karzinome in diesem Bereich transrektal palpiert werden. Bei suspektem Tastbefund schließt sich die Durchführung einer transrektalen Ultraschalluntersuchung (TRUS) mit Entnahme von Stanzbiopsien an, welche den Goldstandard für die Diagnose eines Prostatakarzinoms darstellt. Hierbei werden, sofern möglich, 10 bis 12 Stanzzyylinder aus verschiedenen, karzinomverdächtigen Regionen der Prostata entnommen und histologisch aufgearbeitet.

In den letzten Jahren ist die DRU als Screening-Methode für das Prostatakarzinom zunehmend von der Bestimmung des Serum PSA-Wertes abgelöst worden. In der Schweiz werden lediglich 20% der Prostatakarzinome durch die DRU diagnostiziert, während 80% aufgrund einer Erhöhung des PSA-Wertes entdeckt werden. (Hefermehl L et al., 2010) Auch in Amerika spielte die DRU im Zuge der weitverbreiteten Durchführung des PSA-Screenings lange Zeit nur noch eine untergeordnete Rolle. (Tourville EA et al., 2013) Beim PSA handelt es sich um ein ausschließlich in der Prostata gebildetes Glykoprotein, das zur Verflüssigung des Samens dient. (Wang MC et al., 1981, Pons-Anicet D et al., 1988; Lilja H, 1993) Das

PSA ist somit organspezifisch, jedoch nicht tumorspezifisch, da außer beim Prostatakarzinom auch bei gutartigen Erkrankungen, wie z.B. der benignen Prostatahyperplasie oder nach DRU, erhöhte Serumspiegel gemessen werden können. (Jedinak A et al., 2015)

Seit der Einführung des PSA-Wertes als Tumormarker des Prostatakarzinoms Ende der Achtziger wird dessen Bedeutung kontrovers diskutiert. (Rosser CJ, 2008) Das liegt zum einen daran, dass das Prostatakarzinom eine langsame Tumorverdopplungszeit von 2 bis 4 Jahren aufweist und unbehandelt nur langsam progredient verläuft. Außerdem zeichnet sich diese Erkrankung durch eine geringe Sterberate von 3% aus. Nur etwa die Hälfte der erkrankten Männer stirbt an ihrem Prostatakarzinom. Die routinemäßige Bestimmung des PSA-Wertes im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen birgt daher die Gefahr der Überdiagnostik und Übertherapie sogenannter indolenter Tumore, welche ohne Screening zu Lebzeiten des Patienten nicht symptomatisch geworden wären und auch unbehandelt nicht zum Tode des Patienten geführt hätten. (Stöckle M et al., 2012)

Zwei große Präventionsstudien, die Nutzen und Schaden des PSA-Screenings gegeneinander abwägen sollten, konnten nicht zur Klärung des PSA-Dilemmas beitragen. In der amerikanischen PLCO-Studie konnte keine statistisch signifikante Reduktion der prostatakarzinomspezifischen Mortalität durch PSA-Screening nach sieben bzw. 10 Jahren follow up nachgewiesen werden. (Andriole GL et al., 2009) Aus diesem Grund sprach sich im Jahr 2012 die US Preventive Services Task Force (USPSTF) gegen ein routinemäßiges PSA-Screening bei asymptomatischen Patienten aus. (Wenzler DL et al., 2014) Dem gegenüber konnte in der europäischen ERSPC-Studie nach einem follow up von neun, 11 und 13 Jahren eine signifikante Abnahme der Prostatakarzinom-assoziierten Mortalität belegt werden, die jedoch mit unerwünschter Überdiagnostik verbunden ist. (Schröder FH et al., 2014)

Die widersprüchlichen Ergebnisse dieser Studien werden bis heute kontrovers diskutiert. Dies spiegelt sich auch in den uneinheitlichen Empfehlungen verschiedener internationaler Leitlinien wider. (De Carvalho TM et al., 2015) Die deutsche S3-Leitlinie gibt keinerlei Empfehlung ab. (Schaefer C et al., 2012) Bis heute ist der PSA-Test in Deutschland eine von den Patienten selbst zu bezahlende individuelle Gesundheitsleistung und nicht Bestandteil der gesetzlichen Früherkennungsuntersuchung.

Um das Problem der Übertherapie zu vermeiden, benötigt man Prostatakarzinom-spezifische Biomarker, die zwischen dem aggressiv wachsenden und dem indolenten Tumortyp unterscheiden können. Hierbei konnte eine Kombination von drei Genen identifiziert werden,

deren gemeinsamer, nichtinvasiver Nachweis im Urinsediment von Patienten einen positiv prädiktiven Wert für das Risiko eines Gleason-Scores ≥ 7 hat. Die Kombination aus PSA-Wert-Bestimmung und Nachweis dieser drei Risikogene mittels Next Generation Sequencing (NGS) besitzt somit das Potenzial, in der heterogenen Gruppe der Prostatakarzinome diejenigen zu identifizieren, welche frühzeitig einer aggressiven Therapie zugeführt werden sollten. (Leyten GHJM et al., 2015)

Zusätzlich besteht Grund zu der Annahme, dass mit Hilfe des NGS die Tumore der Patienten bestimmten Subtypen zugeordnet werden können, je nachdem welche Stoffwechselprozesse pathologisch verändert sind. Somit könnten im Sinne einer personalisierten Medizin individuell für jeden Patienten genau die Medikamente ausgewählt werden, die bei dem vorliegenden Risikoprofil erfolgsversprechend sind. (Yadav SS et al., 2015)

Unter den nichtinvasiven Maßnahmen zur Diagnostik eines Prostatakarzinoms bzw. zur Differenzierung zwischen benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom gewinnen micro-RNAs (miRNAs) zunehmend an Bedeutung. Kotb et al. konnten zeigen, dass bestimmte, im Blut zirkulierende miRNAs einen malignen Befund in der Stanzbiopsie mit einer Sensitivität und Spezifität von 80 bis 90% vorhersagen können. (Kotb S et al., 2014) Auch im Prostatasekret konnten miRNAs nachgewiesen werden, welche charakteristischer Weise beim Prostatakarzinom, nicht jedoch bei der benignen Prostatahyperplasie hoch- bzw. runterreguliert sind und somit potenziell als diagnostische Marker genutzt werden könnten. (Guzel E et al., 2015)

Unter den bildgebenden Methoden ist vor allem die Skelettszintigraphie von Bedeutung. Diese stellt das bildgebende Verfahren der Wahl zum Nachweis von Knochenmetastasen dar. Auch die Magnetresonanztomographie (MRT) gewinnt durch eine erhebliche Verbesserung ihrer diagnostischen Genauigkeit durch die multiparametrische MRT zunehmend an Bedeutung für Primärdiagnostik, Biopsieplanung und Staging des Prostatakarzinoms. (Aydin H et al., 2015) Die Domäne der Positronenemissionstomographie/Computertomographie (PET/CT) ist der Nachweis von Fernmetastasen im Rahmen des Stagings und die Rezidivdiagnostik. (Röthke MC et al., 2013)

2.1.4 Klassifikation nach UICC

Für das Staging von Adenokarzinomen der Prostata wird die TNM-Klassifikation herangezogen, welche unterschiedliche Schweregrade hinsichtlich der Ausdehnung des

Primärtumors, des Lymphknotenbefalls und allfälliger Fernmetastasen angibt. Die TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms wird in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1 Übersicht TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (Wittekind C, 2012)

| T – Primärtumor | |
|----------------------------------|---|
| TX | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T0 | Kein Anhalt für Primärtumor |
| T1 | Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist |
| T1a | Tumor zufälliger histologischer Befund in 5% oder weniger des resezierten Gewebes |
| T1b | Tumor zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des resezierten Gewebes |
| T1c | Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert |
| T2 | Tumor begrenzt auf Prostata |
| T2a | Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger |
| T2b | Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens |
| T2c | Tumor in beiden Lappen |
| T3 | Tumor durchbricht die Prostatakapsel |
| T3a | Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig) eingeschlossen mikroskopisch nachweisbare Infiltration des Blasenhalsses |
| T3b | Tumor infiltrierte Samenblase |
| T4 | Tumor ist fixiert oder infiltrierte andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z.B. Sphincter externus, Rektum, und/oder Levatormuskel und/oder ist an der Beckenwand fixiert |
| N – Regionäre Lymphknoten | |
| NX | Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden |
| N0 | Keine regionären Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Regionäre Lymphknotenmetastasen |

| M – Fernmetastasen | |
|---------------------------|----------------------------|
| M0 | Keine Fernmetastasen |
| M1 | Fernmetastasen |
| M1a | Nichtregionäre Lymphknoten |
| M1b | Knochen |
| M1c | Andere Lokalisation(en) |

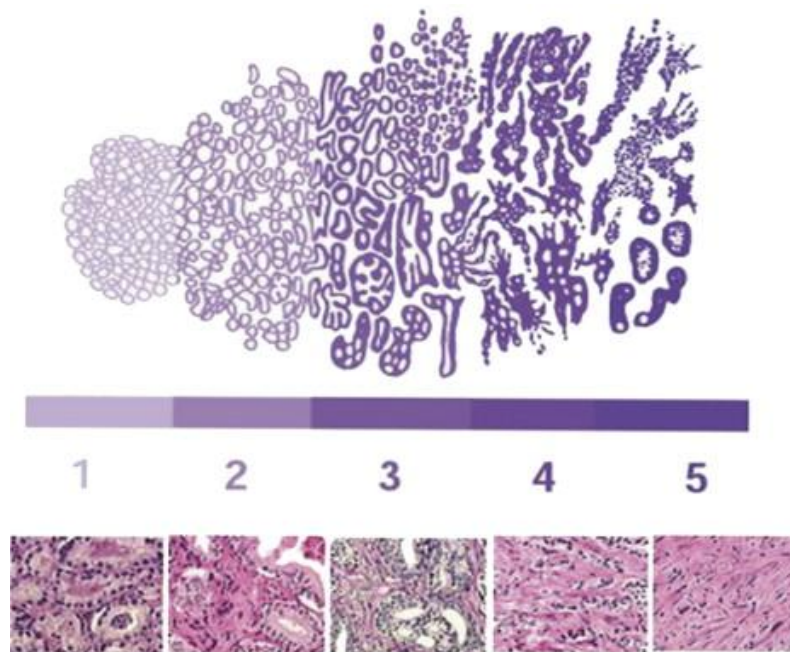
Je nach Staging-Befund werden anhand der TNM-Klassifikation die in Tabelle 2.2 aufgelisteten Krankheitsstadien definiert.

Tab. 2.2 Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms (Wittekind C, 2012)

| | | | |
|-------------|----------|---------|----|
| Stadium I | T1a, T2a | N0 | M0 |
| Stadium II | T2b, T2c | N0 | M0 |
| Stadium III | T3 | N0 | M0 |
| Stadium IV | T4 | N0 | M0 |
| | Jedes T | N1 | M0 |
| | Jedes T | Jedes N | M1 |

Für die Prognose des Prostatakarzinoms sind jedoch nicht nur dessen Größe und Lokalisation entscheidend, sondern auch der Differenzierungsgrad der Tumorzellen, welcher im Rahmen des histopathologischen Gratings mit Hilfe des Gleason-Scores bestimmt wird. Jedem Differenzierungsgrad wird ein Punktwert zwischen 1 (hoch differenziert) und 5 (undifferenziert) zugeordnet. (Epstein JJ et al., 2005) Abbildung 2.1 zeigt einen schematischen sowie mikroskopischen Überblick über die unterschiedlichen histologischen Differenzierungsgrade im Prostatakarzinom, welche in Tabelle 2.3 näher beschrieben werden.

Abb. 2.1 Schematische und mikroskopische Übersicht über die histologischen Differenzierungsgrade des Prostatakarzinoms nach Gleason (Harnden P et al., 2007)



Tab. 2.3 Merkmale der unterschiedlichen Differenzierungsgrade des Prostatakarzinoms nach Gleason (Helpap B et al., 2007)

| Differenzierungsgrad | Merkmale |
|----------------------|---|
| 1 | Umschriebener Knoten dicht gepackter, scharf begrenzter, mittelgroßer Drüsen, rundlich bis oval |
| 2 | Nicht ganz scharf begrenzte Tumorknoten mit minimaler Stromainfiltration, Drüsen lockerer und ungleichmäßiger |
| 3 | Diskrete Drüseneinheiten, kleinere Drüsen als in Muster 1 und 2, Tumordinfiltrate zwischen nicht neoplastischen Drüsen, deutliche Variation in Größe und Form, evtl. kleine kribriforme Tumorknoten |
| 4 | Fusionierte mikroazinäre Drüsen, wenig differenzierte Drüsen mit schwach ausgebildeten Drüsenlichtungen, große kribriforme und papilläre Drüsen mit unscharfen Grenzen |
| 5 | Keine klaren Drüsenformationen, solide Epithelstränge, Komplexe mit zentralen Nekrosen, kribriforme, papilläre oder solide Tumormassen |

Der zusammengesetzte Gleason-Score berechnet sich aus der Summe der beiden am häufigsten vorkommenden Wachstumsmuster. (Hautmann R et al., 2010) Tabelle 2.4 stellt das histopathologische Grading anhand der Punktsomme des Gleason-Scores dar.

Tab. 2.4 Histopathologisches Grading anhand des zusammengesetzten Gleason-Scores (Wittekind C, 2012)

| | |
|--------|---|
| GX | Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden |
| G1 | Gut differenziert (leichte Aplasie) (Gleason 2 - 4) |
| G2 | Mäßig differenziert (mäßige Aplasie) (Gleason 5 - 6) |
| G3 – 4 | Schlecht differenziert/undifferenziert (ausgeprägte Aplasie) (Gleason 7 - 10) |

2.1.5 Therapie

Die Wahl des bestgeeigneten Therapieverfahrens ist stark abhängig vom Alter des Patienten sowie dem vorliegenden Tumorstadium. Generell gilt, dass organbegrenzte Tumore unter kurativer Zielsetzung behandelt werden können, während die Therapie des fortgeschrittenen, metastasierten Prostatakarzinoms rein palliativen Charakter besitzt.

Da das Prostatakarzinom auch unbehandelt nur langsam fortschreitet, profitieren von einer kurativen Therapie lediglich Patienten mit einer Lebenserwartung von mehr als 10 bis 15 Jahren bei Diagnose. (Leitlinienprogramm Onkologie, 2014)

Aufgrund des fortgeschrittenen mittleren Erkrankungsalters von 70 Jahren und der zu diesem Zeitpunkt oft bereits vorliegenden bzw. sich in den nächsten Jahren entwickelnden, altersbedingten Multimorbidität versterben mehr als 50% der Prostatakarzinompatienten an interkurrenten Erkrankungen und nicht an Prostatakrebs.

Für die Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms stehen laut europäischer und deutscher Leitlinie vier Therapieoptionen zur Verfügung. Hierzu gehören die offene oder Roboter-assistierte radikale Prostatektomie, die perkutane Bestrahlung, die permanente Seedimplantation und Active surveillance. (Sänger S et al., 2015) Mangels klinisch hochwertiger Studien konnte bisher für keine Therapie ein signifikanter Vorteil gegenüber den anderen Behandlungsoptionen belegt werden. (Stöckle M et al., 2012) Dies soll durch die PREFERE-Studie geändert werden, in der die therapeutische Effektivität der unterschiedlichen Behandlungsmöglichkeiten ebenso wie deren Unterschiede bezüglich Nebenwirkungen und Lebensqualität der Patienten verglichen werden sollen. Es handelt sich hierbei um eine multizentrische, prospektive Studie, in deren Rahmen über einen Zeitraum

von 4 Jahren 7600 Patienten, die bestimmte Qualifikationskriterien erfüllen müssen, rekrutiert werden sollen. Diese sollen den unterschiedlichen Behandlungsarmen zugeteilt und über 13 Jahre nachbeobachtet werden. (Wiegel T et al., 2013)

Therapie der Wahl des fortgeschrittenen, metastasierten Prostatakarzinoms ist die Hormonablation durch Androgenentzug. (Sharifi N et al., 2010) Diese kann sowohl chirurgisch mittels subkapsulärer oder radikaler, bilateralater Orchiectomie als auch medikamentös erreicht werden. Zu den verwendeten Substanzklassen gehören LHRH-Agonisten und –Antagonisten, Androgen-Rezeptor-Antagonisten (Antiandrogene) und Hemmstoffe der Androgensynthese. Nach wie vor bestehen Kontroversen, wie der Androgenentzug am besten durchgeführt werden sollte. Standardtherapien stellen derzeit die bilaterale Orchiectomie und die Monotherapie mit kontinuierlicher Gabe eines LHRH-Agonisten dar. Alternativ kann eine Monotherapie mit nichtsteroidalen Antiandrogenern, eine kombinierte Androgenblockade durch Kombination von LHRH-Agonist und nichtsteroidalem Antiandrogen sowie eine intermittierende hormonablativ Therapie durchgeführt werden. (Loblaw DA et al., 2007)

Bei letzterer erfolgt ein intermittierender, PSA-gesteuerter Androgenentzug. Diese Therapieform ist der kontinuierlichen Hormonablation im Hinblick auf Langzeitüberleben und Zeit bis Progression ebenbürtig bei gleichzeitig geringeren Behandlungsunannehmlichkeiten und –kosten, weswegen sie bei allen Patienten mit initial gutem Ansprechen auf den Androgenentzug empfohlen wird. (Niraula S et al., 2013)

Da jedoch rund 20% der Prostatakarzinomzellklone hormonresistent sind, kommt es initial nur bei 75-80% der Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom zu einem Ansprechen auf die Androgen Deprivation Therapy (ADT). Selbst nach anfänglichem Ansprechen auf die Hormonablation kommt es durchschnittlich nach 18 Monaten trotz niedriger Androgenspiegel zu einer klinischen Tumorprogression, eventuell in Verbindung mit einem erneuten PSA-Anstieg. Dieses Krankheitsstadium wird als kastrationsresistentes Prostatakarzinom (CRPC) bezeichnet, nachdem 2008 die Nomenklatur geändert wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt sprach man von hormonrefraktärem Prostatakarzinom. Diese Änderung der Nomenklatur wurde nötig, da durch neuartige antihormonelle Therapien mit z.B. Abirateron oder Enzalutamid ein erneutes medikamentöses Ansprechen trotz Tumorprogression unter Kastrationstherapie erreicht werden konnte. (Cathomas R, 2011)

An der Entwicklung des CRPC sind mehrere Mechanismen ursächlich beteiligt. (Pienta KJ et al., 2006) Generell gilt, dass das Wachstum der Prostatakarzinomzellen entgegen früherer Annahme weiterhin von Androgenen abhängig ist. (Mostaghel EA et al., 2007) Unter Androgendeprivation gewinnen anstelle der in Nebenniere und Gonaden gebildeten Hormone im Tumormicroenvironment selbst synthetisierte Androgene an Bedeutung. Diese stimulieren die Androgenrezeptoren über auto- bzw. parakrine Mechanismen. (Efsthathiou E et al., 2010)

Durch Genamplifikationen des für den Androgenrezeptor kodierenden Gens bzw. durch Mutationen der Ligandenbindungsstelle am Androgenrezeptor kann es ferner zu dessen Sensibilisierung gegenüber niedrigeren Androgenkonzentrationen kommen. (Antonarakis ES et al., 2011) Außerdem kann durch Mutationen die Spezifität des Androgenrezeptors für seinen Liganden herabgesetzt werden, so dass auch andere Stoffe, wie z.B. Östrogene, in der Lage sind, diesen zu aktivieren. Dem gegenüber ist auch eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors durch z.B. Zytokine und Wachstumsfaktoren des Tumormicroenvironments möglich. In diesem Zusammenhang spielen Splicevarianten des Androgenrezeptors eine wichtige Rolle. (Waltering KK et al., 2012) Während diese alternativen Formen des Androgenrezeptors im unbehandelten Prostatakarzinom eine Rarität darstellen, konnten im CRPC eine Vielzahl unterschiedlicher Splicevarianten nachgewiesen werden. Da weiterhin im Xenograft-Mausmodell gezeigt werden konnte, dass eine Kastration der Mäuse die verstärkte Expression von Splicevarianten des Androgenrezeptors induziert (Watson PA et al., 2010), besteht Grund zu der Annahme, dass durch die Hormonablation Tumorzellen selektiert werden, welche diese alternativen Formen des Androgenrezeptors exprimieren. Unter der Vielzahl an möglichen Splicevarianten sind für die Entwicklung eines CRPC vor allem diejenigen relevant, welche durch den Verlust ihrer Liganden-Bindungsstelle Liganden-unabhängig und somit konstitutiv aktiviert werden. (Sprenger CCT et al., 2014) Weiterhin ist ein Androgenrezeptor-unabhängiger Tumorprogress über neue, wachstumsfördernde Signalwege möglich. (Karantanos T et al., 2013)

Einige Autoren gehen davon aus, dass das CRPC aus Krebsstammzellen entsteht. Dabei handelt es sich um eine seltene Zellpopulation innerhalb des Prostatakarzinoms, die sich durch eine geringe Expression von Androgenrezeptoren auszeichnet und deren Überleben nicht von Androgenen abhängig ist. Stattdessen werden die Überlebens- und Wachstumssignale von Fibroblasten, Gefäßendothelien und anderen Zellarten innerhalb ihrer eigenen Stammzellnische zur Verfügung gestellt. Daher bleiben sie von der antihormonellen

Therapie weitgehend unbeeinflusst und können angesichts ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung letztlich zur Entstehung eines CRPC führen. (Adisetiyo H et al., 2014)

Therapeutisch steht neben einer Chemotherapie mit Taxanen die medikamentöse Therapie mit Abirateron zur Verfügung. Abirateron ist in der Lage, das Gesamtüberleben von Patienten mit CRPC signifikant zu verlängern. (De Bono JS et al., 2011) Es handelt sich um einen Testosteron-Inhibitor, der nicht nur die testikuläre Androgenproduktion hemmt, sondern darüber hinaus auch die Testosteronproduktion in Nebenhoden und dem Tumorgewebe selbst inhibiert. Seine Wirkung beruht auf der Inhibition von Cytochrom P-450c17, dem Schlüsselenzym der Testosteronbiosynthese. (Ang JE et al., 2009; Fizazi K et al., 2012) Auf der Grundlage der Ergebnisse der AFFIRM-Studie wurde im Jahr 2012 der Wirkstoff Enzalutamid von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Therapie von Patienten mit metastasiertem CRPC und vorausgegangener Chemotherapie mit Docetaxel zugelassen. (Joshua AM et al., 2015) Es handelt sich um ein Antiandrogen der zweiten Generation, welches auf drei unterschiedlichen Ebenen in die vom Androgenrezeptor regulierte Signaltransduktionskaskade eingreift. (Tran C et al., 2009) Es inhibiert kompetitiv die Bindung der Androgene an den Androgenrezeptor und somit dessen Aktivierung. Zusätzlich verhindert Enzalutamid die Translokation des aktivierten Androgenrezeptors in den Zellkern sowie dessen Bindung an die DNA, wodurch letztlich Apoptose induziert wird. (Ramadan WH et al., 2015) In der PREVAIL-Studie konnte gezeigt werden, dass auch Männer mit metastasiertem CRPC ohne vorherige Chemotherapie mit Docetaxel von einer Therapie mit Enzalutamid profitieren. (Beer TM et al., 2014) Aus diesem Grund wurde Enzalutamid im September 2014 auch zur Erstlinientherapie dieses Krankheitsstadiums zugelassen.

Eine weitere Säule der Behandlung des CRPC stellt die Therapie dar, durch dessen Metastasen ausgelöst, Komplikationen dar. Hierbei stehen aufgrund der bevorzugten Metastasierung des Prostatakarzinoms ins Skelett ossäre Komplikationen im Vordergrund. Bei rund 80% der an einem Prostatakarzinom verstorbenen Patienten lassen sich in der Autopsie Knochenmetastasen nachweisen. Rund 50% der Patienten mit ossär metastasiertem Prostatakarzinom leiden innerhalb von 2 Jahren nach Diagnose unter skelettalen Komplikationen. (Paparella S et al., 2011)

Hierzu gehören, neben Schmerzen und der Gefahr einer Hyperkalziämie, Deformierungen bzw. Sinterungen der Wirbelkörper, pathologische Frakturen sowie die Kompression des Rückenmarks. (Heidenreich A, 2003)

Dies führt zur Reduktion der Funktionalität und Mobilität des Bewegungsapparates und somit letztlich zur Einschränkung der Lebensqualität, verbunden mit einem hohen Ausmaß an Morbidität. Bei lokalen Knochenschmerzen und erhöhtem Frakturrisiko bzw. der Gefahr einer spinalen Kompression kommen neben der Gabe von Analgetika eine lokale Bestrahlung in Kombination mit einer chirurgischen Stabilisierung bzw. eine alleinige chirurgische Intervention in Frage. Zur medikamentösen Therapie bei multiplen, symptomatischen Metastasen stehen Denosumab, ein humaner, monoklonaler Antikörper gegen den von Osteoblasten gebildeten RANK-Ligand (RANKL) und das Bisphosphonat Zoledronsäure zur Verfügung. Beide Substanzklassen senken über die Inhibition von Osteoklasten das Risiko für Frakturen, Schmerzen und Hyperkalzämie im fernmetastasierten Prostatakarzinom. Durch den verminderten Abbau der Knochenmatrix wird die Abnahme der Knochendichte reduziert, weswegen Bisphosphonate auch zur Behandlung der Osteoporose zugelassen sind. (Janovská Z, 2012)

Obwohl das Prostatakarzinom osteoblastische Metastasen verursacht, üben Medikamente, die die Osteoklasten inhibieren, einen positiven Einfluss aus. Dies liegt daran, dass von Osteoklasten Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β sezerniert werden, welche für die metastatisch ausgesäten Tumorzellen einen geeigneten Nährboden im Knochen schaffen. (Green JR et al., 2002) Für die Ausbildung der osteoblastischen Knochemetastasen ist somit zumindest initial die Aktivierung von Osteoklasten von entscheidender Bedeutung.

In mehreren Studien konnte für Denosumab eine signifikante Überlegenheit im Hinblick auf die Prävention skelettbezogener Komplikationen im CRPC gegenüber der therapeutisch ebenfalls eingesetzten Zoledronsäure nachgewiesen werden. (Fizazi K et al., 2011; Lipton A et al., 2012)

Trotzdem ist in den letzten Jahren die Zoledronsäure zunehmend in den Fokus klinischer Studien gerückt, da für sie in vitro, abgesehen von ihrer antiresorptiven Wirkung auf die Osteoklasten, weitere günstige Nebeneffekte im CRPC nachgewiesen werden konnten. (Morgan C et al., 2007)

2.2 Bisphosphonate

Bisphosphonate sind potente Inhibitoren der Knochenresorption durch Osteoklasten und werden als Medikamente der ersten Wahl hauptsächlich zur Therapie von Osteoporose und Knochenmetastasen eingesetzt. Es handelt sich um synthetisch hergestellte Strukturanaloga des anorganischen Pyrophosphats (PP_i). Sie zeichnen sich im Vergleich zu PP_i durch eine

höhere Stabilität aus und sind resistent gegenüber einer hydrolytischen Spaltung durch Osteoklasten. (Clézardin P, 2005)

Alle Bisphosphonate besitzen eine typische Strukturformel, welche durch zwei Phosphatgruppen, die an ein zentrales Kohlenstoffatom gebunden sind, gekennzeichnet ist. Somit entsteht eine P-C-P Struktur. An das zentrale Kohlenstoffatom sind weiterhin zwei Seitenketten, welche als R_1 und R_2 bezeichnet werden, kovalent gebunden. Das P-C-P-Grundgerüst und die R_1 Seitenkette ermöglichen eine starke Bindung an die Hydroxylapatitkristalle des Knochens. Die Veränderung der Substituenten der beiden Seitenketten erlaubt eine große Anzahl möglicher Variationen, wobei kleine strukturelle Veränderungen, insbesondere an der R_2 -Seitenkette, große Auswirkungen auf die physikochemischen, biologischen, therapeutischen und toxikologischen Eigenschaften haben. (Fleisch H, 2002)

Je nachdem, ob die R_2 Seitenkette ein Stickstoffatom enthält oder nicht, können stickstoffhaltige und stickstofffreie Bisphosphonate voneinander unterschieden werden. Beide Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Wirkmechanismus und ihrer Interaktion mit den Osteoklasten. (Boonyapakorn T et al., 2008)

Stickstofffreie Bisphosphonate werden von den Osteoklasten im Zuge der Knochenresorption aufgenommen und lösen intrazelluläre Mechanismen aus, welche zur Induktion von Apoptose führen. (Lobato JV et al., 2008) Dabei werden die Bisphosphonate intrazellulär zu zytotoxischen Analoga von Adenosintriphosphat (ATP) metabolisiert. (Auriola S et al., 1997) Die Akkumulation dieser Metabolite im Zytoplasma löst letztlich über eine Inhibition der mitochondrialen ADP/ATP-Translokase Apoptose aus. (Lehenkari PP et al., 2002)

Der Wirkmechanismus der potenteren, stickstoffhaltigen Bisphosphonate ist komplexer und noch nicht vollends geklärt. Sie lösen ebenfalls Apoptose aus, stören jedoch zusätzlich die Differenzierung der Osteoklasten und ändern die Dynamik ihres Zytoskeletts. (Green J et al., 2010)

Im Gegensatz zu den stickstofffreien werden die stickstoffhaltigen Bisphosphonate nicht metabolisiert. Stattdessen führen sie zur Aktivierung von Caspasen und zur Induktion von Apoptose, indem sie die post-translationale Prenylierung kleiner GTP-bindender Proteine verhindern. Ursächlich hierfür ist die Inhibition von Enzymen des Mevalonatwegs. (Benford HL et al., 1999) Das wichtigste Zielenzym der Aminobisphosphonate ist die Farnesylpyrophosphat Synthase (FPPS), welches ein Schlüsselenzym des Mevalonatweges

darstellt. Zusätzlich interferieren stickstoffhaltige Bisphosphonate mit einem weiteren downstream Enzym des Mevalonatweges, der Geranylgeranylpyrophosphat Synthase (GGPPS). Durch Hemmung dieser Enzyme fehlen Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), welche für den post-translationalen Transfer von Isoprenoiden auf GTPasen unerlässlich sind. Diese Modifikation ist essentiell für die korrekte Funktion dieser Signalproteine, da deren physiologische Verankerung in der Zellmembran erst hierdurch ermöglicht wird. G-Proteine der Ras-, Rho- und Rac-Familie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion und des Zellüberlebens beteiligt und spielen eine wichtige Rolle für vesikuläre Transporte, die Signaltransduktion, die Zelladhäsion und das Zytoskelett. Aufgrund der Komplexität der durch sie regulierten Signalkaskaden führt ein Verlust funktionstüchtiger G-Proteine unvermeidlich zu gestörter Zellfunktion, wodurch letztlich indirekt Apoptose ausgelöst wird. (Rogers MJ, 2004)

Durch die Hemmung der FPPS des Mevalonatweges kommt es zusätzlich zur intrazellulären Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat (IPP), welches durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in das zytotoxische ATP-Analogon ApppI umgewandelt wird. Dieses induziert, ähnlich wie das aus den stickstofffreien Bisphosphonaten synthetisierte ATP-Analogon vom AppCp-Typ, direkt Apoptose in Osteoklasten durch die Blockade der mitochondrialen ADP/ATP-Translokase. (Mönkkönen H et al., 2006)

Bisphosphonate können sowohl oral als auch intravenös appliziert werden. Oral verabreichte Bisphosphonate werden schlecht resorbiert, nur etwa 1% der aufgenommenen Dosis gelangt in den Knochen. Durch intravenöse Darreichung kann die Bioverfügbarkeit im Knochen auf 50% gesteigert werden. (Giger EV et al., 2013)

Die Verträglichkeit der Bisphosphonate ist sehr gut. In klinischen Studien gab es keinen Unterschied hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils zwischen Bisphosphonat- und Placebogruppe. Zu den häufig berichteten unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Bisphosphonate gehören Kieferosteonekrosen, atypische Femurfrakturen, Vorhofflimmern und Ösophaguskarzinome. Desweiteren wurde in seltenen Fällen über das Auftreten von grippeartigen Symptomen, Nierenschäden, gestörter Frakturheilung und gastroösophagealer Beschwerden wie Dyspepsie und Ösophagitiden nach oraler Aufnahme berichtet. (McClung M et al., 2013)

Die Zoledronsäure, ein Aminobisphosphonat der dritten Generation, ist der potenteste Inhibitor der Knochenresorption und das einzige Bisphosphonat, für das eine statistisch

signifikante Reduktion skelettaler Komplikationen bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom nachgewiesen werden konnte. (Saad F et al., 2004)

Bisphosphonate sind jedoch nicht nur potente Inhibitoren der Knochenresorption. In einer Vielzahl von Studien konnte für Aminobisphosphonate, nicht jedoch für stickstofffreie Vertreter dieser Substanzklasse, zusätzlich eine direkte Antitumor-Aktivität gegen eine Vielzahl von Tumorzellen in vitro nachgewiesen werden. Hierzu gehören Mammakarzinom- (Senaratne SG et al., 2000), Melanom- (Riebeling C et al., 2002), Osteosarkom- (Mackie PS et al., 2001; Sonnemann J et al., 2001), Myelom- (Shipman CM et al., 1998) und Prostatakarzinomzellen (Lee MV et al., 2001). Die antitumorale Wirkstärke der Aminobisphosphonate spiegelt hierbei ihre antiresorptive Potenz wider. Somit stellt die Zoledronsäure in beiderlei Hinsicht den potentesten Vertreter unter den Aminobisphosphonaten dar. (Brown JE et al., 2004)

Als relevante Wirkmechanismen konnten zum einen eine starke Hemmung der Zellproliferation und die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei der Induktion von Apoptose in Osteoklasten scheint hierfür die Inhibition der FPPS und der GGPPS des Mevalonatweges eine entscheidende Rolle zu spielen. Hierdurch wird, wie bereits erwähnt, unter anderem die Prenylierung der GTPase Ras verhindert. Dies führt zu einer gestörten Downstream-Kaskade des Ras/Raf-1/MEK/ERK 1-2 Mitoseweges und des PKB/Akt Antiapoptoseweges mit konsekutiver Aktivierung von Caspasen. (Clézardin P et al., 2005)

Als weiterer, diesmal indirekter Mechanismus der Antitumoraktivität der Zoledronsäure in vitro spielt eine Immunmodulation durch Aktivierung zytotoxischer T-Zellen eine nicht unerhebliche Rolle. Es handelt sich hierbei um $\gamma\delta$ -T-Zellen, eine kleine Subgruppe von T-Zellen, welche Phosphoantigene, die von einigen Tumorzellen überexprimiert werden, spezifisch erkennen und die entsprechenden Krebszellen gezielt abtöten können. (Hamilton E et al., 2011) Durch die Inhibition von FPPS und GGPPS kommt es zur Akkumulation von IPP, was auf bislang unbekannte Art und Weise von $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt werden kann, die daraufhin aktiviert und zur Proliferation stimuliert werden. (Roelofs AJ et al., 2009) Benzaid I. und Clézardin P. konnten in unveröffentlichten Ergebnissen zeigen, dass IPP auch von Tumorzellen sezerniert werden kann, wodurch die chemotaktische Migration von $\gamma\delta$ -T-Zellen zum Tumor stimuliert wird.

In mehreren Studien wurde jedoch bewiesen, dass es neben der Interferenz mit dem Mevalonatweg noch weitere, davon unabhängige Wirkmechanismen geben muss. Durch Substitution des fehlenden Farnesols bzw. Geranylgeranols war die Inhibition der Zellfunktionen nur teilweise reversibel, so dass die Vermutung nahe liegt, dass weitere, von der Prenylierung kleiner GTPasen unabhängige Stoffwechselwege von der Zoledronsäure beeinflusst werden. (Clézardin P, 2011)

Dazu gehört die RhoA-unabhängige Reduktion der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 auf der Oberfläche von Tumorzellen, welcher den Zielrezeptor von CXCL-12 darstellt. Das Chemokin CXCL-12 induziert die Migration von Tumorzellen. Die Zoledronsäure inhibiert somit über einen weiteren, vom Mevalonatweg unabhängigen Mechanismus die Tumorzellmigration. (Denoyelle C et al., 2003)

Auch in vivo konnte eine antitumorale Aktivität der Zoledronsäure nachgewiesen werden. Hierzu gehören ebenfalls indirekte Mechanismen, wie die Suppression der tumorinduzierten Angiogenese durch Reduktion der zirkulierenden VEGF-Spiegel bei Krebspatienten mit Zoledronsäuretherapie. (Santini D et al., 2003; Santini D et al., 2007)

Ferner kommt es, wie bereits erwähnt, zur verringerten Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen wie TGF- β aus dem Knochen, die die Ansiedlung von im Blut zirkulierenden Tumorzellen ermöglichen und das weitere Tumorwachstum fördern. Durch die Inhibition der Osteoklasten wird die Vorbereitung eines fruchtbaren Bodens für die metastatischen Tumorzellen verhindert. (Stresing V et al., 2007) Außerdem übt die Zoledronsäure einen inhibitorischen Effekt auf bereits bestehende Knochenmetastasen aus und bewirkt eine Abnahme der Tumorlast, sichtbar an einem Abfall des Serum-PSA-Wertes. (Corey E et al., 2003)

Zusätzlich wurde auch in vivo eine direkte, von den Osteoklasten unabhängige antitumorale Aktivität gegen Tumorzellen im Knochen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zoledronsäure auch in Mäusen, welche keine Osteoklasten bilden können, das Tumorwachstum reduziert. (Hirbe AC et al., 2009)

Die Metastasierung eines soliden Tumors erfordert zahlreiche Teilleistungen der Krebszellen wie Proliferation, Induktion von Angiogenese, die Fähigkeit zu Migration, Invasion bzw. Extravasation in entfernte Gewebe, Adhäsion und Schutz vor der Immunabwehr. (Mundy GR, 2002) Durch die Zoledronsäure kann eine Vielzahl dieser Teilaspekte inhibiert werden, weswegen sie ein ausgeprägtes antimetastatisches Potenzial besitzt. (Montague R et al., 2004)

Da für die Zoledronsäure sowohl in vitro als auch in vivo direkte und indirekte antitumorale Effekte gegen Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden konnten und sie ferner gut verträglich ist, stellt sie ein vielversprechendes Medikament für die Therapie vor allem des CRPC dar. Die pharmakokinetischen Eigenschaften der Zoledronsäure, welche durch eine kurze Plasmahalbwertszeit mit rascher renaler Clearance und eine hohe Knochenaffinität mit dortiger Akkumulation gekennzeichnet sind, begrenzen jedoch ihre antitumorale Aktivität in vivo. (Caraglia M et al., 2010) In einigen Studien, in denen in vitro eine direkte antitumorale Aktivität gegen Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden konnte, wurden Zoledronsäurekonzentrationen verwendet, die dem Zehnfachen der gemessenen Serumspiegel gängiger Therapieschemata entsprechen. (Lee MV et al., 2001) Es ist unwahrscheinlich, dass derart hohe Zoledronsäurekonzentrationen in vivo in extraskelettalen Geweben wie zum Beispiel der Prostata als Sitz des Primärtumors erreicht werden können. Die häufigere Applikation oder die Gabe höherer Dosen erhöht das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen, die zum Teil bereits unter Verwendung gängiger Dosierungsschemata beobachtet wurden. (Scheper MA et al., 2009) Die Senkung der Affinität der Zoledronsäure zur knöchernen Matrix stellt daher einen vielversprechenden Ansatz dar, die Inhibierung des Tumorwachstums in vivo zu optimieren. (Fournier PGJ et al., 2008)

2.3 Nanotechnologie

Die Nanotechnologie erforscht die gezielte, kontrollierte Entwicklung und Synthese von Strukturen, Bauelementen und Systemen mit einem Längendurchmesser zwischen einem und 100 Nanometer. Wie in vielen anderen Bereichen findet sie auch in der Medizin Anwendung, insbesondere bei der Entwicklung von Medikamenten. (Farokhzad OC et al., 2009) Nanomedikamente stellen Systeme zur Verabreichung von Pharmaka dar, die sich klassischerweise in einer Größenordnung kleiner als 500nm bewegen. Im Gegensatz zur Reinsubstanz besitzen sie neuartige Eigenschaften, welche sowohl in pharmakologischer als auch in therapeutischer Hinsicht von Vorteil sind. (Devalapally H et al., 2007)

Pharmaka können entweder im Inneren von Nanopartikeln verpackt (enkapsuliert) oder kovalent an diese gebunden werden und liegen bis zu ihrer Freisetzung als inaktive Prodrugs vor. (Zamboni WC, 2005) Die Verteilung der beladenen Nanovektoren im Körper ist bis zur Freisetzung des eigentlichen Wirkstoffes vom pharmakokinetischen Profil des Nanocarriers abhängig. (Laginha K et al., 2005) Erst danach kommen die pharmakokinetischen Eigenschaften des eigentlichen Wirkstoffes zum Tragen. Durch den Einsatz der Nanotechnologie ist es somit möglich, hydrophobe Medikamente wasserlöslich zu machen

und die biliäre bzw. renale Clearance von Pharmaka zu reduzieren. Beide Mechanismen führen zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit der nanomodifizierten Medikamente. (Gao Z et al., 2012)

Nanomodifizierte Medikamente reichern sich im Gegensatz zu Nanopartikel-freien Darreichungsformen in Tumoren sowie in Organen des retikuloendothelialen Systems (RES) wie Leber und Milz an (Drummond DC et al., 1999), wo sie verstärkt durch das mononukleär-phagozytäre System (MPS) abgebaut werden. Durch Einbau von Polyethylenglykol (PEG) in die Oberfläche von Nanopartikeln kann deren Aufnahme in die Organe des RES reduziert werden. (Gabizon A et al., 1988) Daraus resultiert ein geringerer Abbau der pegylierten Nanopartikel durch das MPS (Bazile D et al., 1995), was zu einem Anstieg ihrer Plasmahalbwertszeit und somit ihrer Bioverfügbarkeit führt (Allen TM et al., 1989).

Bei den meisten Chemotherapeutika handelt es sich um stark toxische Substanzen mit systemischen Nebenwirkungen, geringer Bioverfügbarkeit und ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften. Viele Studienergebnisse sprechen dafür, dass durch den Einsatz der Nanotechnologie die Toxizität von Chemotherapeutika auf das Tumorgewebe begrenzt werden kann, während gesunde Zellen in der unmittelbaren Nachbarschaft geschont werden. Dies kann über zwei unterschiedliche Mechanismen gewährleistet werden. (Zamboni WC et al., 2012) Zum einen kommt es passiv über abnorm durchlässige Tumorgefäße zu einem verstärkten Austritt von Makromolekülen wie zum Beispiel Nanopartikeln aus der Blutbahn ins Tumorgewebe mit konsekutiver Akkumulation. (Matsumura Y et al., 1986) Zusätzlich ist ein aktives Ansteuern von Tumorzellen mittels multifunktionaler Nanopartikel möglich, welches auch als aktives „targeting“ bezeichnet wird. Dabei kommen Nanovektoren zum Einsatz, an deren Oberfläche Antikörper oder andere Liganden gekoppelt sind, welche nur die spezifische, rezeptorvermittelte Bindung der Nanocarrier an bestimmte Strukturen erlauben. Ein Beispiel für ein organspezifisches Zielmolekül im Prostatakarzinom stellt das prostataspezifische Membranantigen dar. (Gu F et al., 2008) Durch das aktive Ansteuern von Tumorzellen kann die Wirkeffizienz von Medikamenten im Vergleich zum passiven Mechanismus der erhöhten Permeabilität und Retention nochmals gesteigert werden. (Choi CHJ et al., 2010)

Häufig kommt es nach einem initialen Ansprechen auf eine Chemotherapie zu einer intrinsischen bzw. erworbenen Resistenz der Tumorzellen auf die applizierten Medikamente. Auch zur Überwindung dieser Chemotherapeutikaresistenz hat sich die Nanotechnologie in vielfältiger Weise bewährt. (Milane L et al., 2011)

Die mannigfaltigen Mechanismen, über die die Nanotechnologie das pharmakokinetische Profil von Pharmaka und die Chemotherapeutikaresistenz von Tumoren beeinflussen kann, haben zu einem Wandel bei der Entwicklung neuer Medikamente geführt. Während früher vor allem die Findung neuer Wirkstoffe im Vordergrund stand, gewinnt heute die Beeinflussung bzw. Veränderung der Eigenschaften bereits vorhandener, bekannter Medikamente im Sinne eines „drug design“ zunehmend an Bedeutung. (Thorley AJ et al., 2013)

Speziell für die Einschleusung der Zoledronsäure in unter anderem auch Prostatakarzinomzellen wurden an der Universität von Neapel zwei auf der Nanotechnologie basierende Carriersysteme entwickelt. Hierbei handelt es sich zum einen um sogenannte „stealth liposomes“ und zum anderen um „self-assembly nanoparticles“. Die stealth liposomes stellen Zoledronsäure enkapsulierende pegylierte Liposomen mit einem mittleren Durchmesser von 200 – 240nm dar. Ihre Größe entspricht somit in etwa den Lücken im fenestrierten Endothel von Tumorgefäßen. Im Vergleich zur freien Zoledronsäure zeichnen sie sich durch verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften mit geringerer Bindung an die knöcherne Matrix, einer verlängerten Plasmahalbwertszeit und einer stärkeren Akkumulation im Tumorgewebe aus. Durch diese als LipoZOL bezeichnete Nanomodifikation konnte sowohl in vitro als auch in vivo eine Potenzierung der Antitumor-Aktivität der freien Zoledronsäure erzielt werden. Neben einer statistisch signifikanten Steigerung der Proliferationshemmung wurde im PC-3 Xenograft-Mausmodell eine starke antiangiogenetische Wirkung beobachtet. Diese wurde von einer signifikanten Abnahme der Tumorgöße ohne Induktion von Nekrose und zusätzlich einem verlängertem Gesamtüberleben begleitet. Trotz der gesteigerten Toxizität im Tumorgewebe wurde die LipoZOL von den Mäusen gut toleriert. Es wurden weder Gewichtsverluste noch LipoZOL induzierte Todesfälle beobachtet. (Marra M et al., 2011)

Unter den unterschiedlichen Verfahren zur Herstellung von self-assembly nanoparticles hat sich die Synthese von pre-PLCaPZ NPs durchgesetzt. Diese pegylierten, Zoledronsäure enkapsulierenden und sich selbst zusammensetzenden Nanopartikel besitzen die besten technologischen Eigenschaften. Sie können einfach synthetisiert werden und zeichnen sich durch die geringste Zytotoxizität sowie die stärkste Potenzierung des antiproliferativen Potenzials der Zoledronsäure aus. Zur Herstellung von pre-PLCaP NPs wird die freie Zoledronsäure mit Nanopartikeln auf Calciumphosphat-Basis komplexiert. Anschließend werden die dabei entstandenen CaPZ NPs mit kationischen Liposomen im gleichen Mengenverhältnis gemischt. Auf gleiche Weise können auch Zoledronsäure-freie

Kontrollpartikel synthetisiert werden. Für die ca. 150nm großen pre-PLCaPZ NPs konnte ähnlich wie für die LipoZOL eine verbesserte Bioverfügbarkeit im extraskelletalen Gewebe sowie eine Potenzierung der Antitumor-Aktivität der freien Zoledronsäure in vitro und im Xenograft-Mausmodell nachgewiesen werden. Es kam weder zu einer negativen Beeinflussung des Körpergewichtes der Mäuse, noch wurde eine gesteigerte Mortalität der Tiere beobachtet. (Salzano G et al., 2011)

Der Einsatz der Nanotechnologie stellt aufgrund oben genannter Beispiele folglich einen vielversprechenden Ansatz dar, die pharmakokinetischen Eigenschaften der Zoledronsäure zu verändern und somit ihre Bioverfügbarkeit im extraskelletalen Gewebe zu steigern. (Shmeeda H et al., 2013) Dadurch könnten neue Möglichkeiten zur Therapie des CRPC erschlossen werden.

2.4 Tumormicroenvironment

Bei Malignomen handelt es sich meist um von Epithelzellen ausgehende Karzinome. Die Entwicklung eines bösartigen Tumors ist jedoch nicht auf pathologische Veränderungen der Epithelzellen beschränkt. Im Rahmen der Karzinogenese spielen vielmehr komplexe Wechselwirkungen zwischen Tumorepithelzellen und umgebenden stromalen Zellen sowie extrazellulären Matrixkomponenten eine fundamentale Rolle. Letztere bilden zusammen das Tumormicroenvironment, welches essentiell für das Wachstum von Krebszellen und deren Fähigkeit zu Migration, Invasion und metastatischer Absiedlung ist. Das „reaktive“ Tumorstroma unterscheidet sich häufig grundlegend vom Stroma des korrespondierenden gesunden Gewebes und ist gekennzeichnet durch eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) sowie einen erhöhten Anteil an Mikrogefäßen, Entzündungszellen und aktivierten Fibroblasten. (De Wever O et al., 2003). Die stromalen Veränderungen können hierbei im Sinne einer Coevolution zeitgleich mit der malignen Transformation der Epithelzellen auftreten oder dieser vorausgehen. Innerhalb des desmoplastischen Stromas des Tumormicroenvironments sind aktivierte Fibroblasten vom myofibroblastischen Phänotyp von besonderer Bedeutung. Diese befinden sich in der unmittelbaren Nachbarschaft der Tumorepithelzellen und beeinflussen deren Phänotyp über Zell-Zell-Interaktionen und durch die Modifikation extrazellulärer Matrixkomponenten. (Micke P et al., 2004)

Fibroblasten können generell die Differenzierung von Zellen beeinflussen. Während einerseits nicht aktivierte Fibroblasten Tumorzellen wieder in einen differenzierteren Phänotyp mit langsamerem Wachstumsverhalten konvertieren können, können Myofibroblasten oder

„cancer associated fibroblasts“ (CAFs) zur malignen Transformation von Epithelzellen führen. (Hayashi N et al., 1991) Myofibroblasten stellen per se keinen pathologischen Zelltyp dar, sondern können auch unter physiologischen Bedingungen in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden. (Powell DW et al., 1999) Für die Aktivierung bzw. Differenzierung von Fibroblasten zu tumorassoziierten Myofibroblasten oder CAFs werden durch Zell-Zell-Kontakte und lösliche Faktoren wie Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren vermittelte Interaktionen verantwortlich gemacht. Das Zytokin TGF β scheint hierfür am wichtigsten zu sein, da es den einzigen Wachstumsfaktor darstellt, der sowohl in vitro als auch in vivo zur Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten führt. (Tuxhorn JA et al., 2002b) Innerhalb des Tumorgewebes kann TGF β von Epithelzellen, Entzündungszellen oder CAFs sezerniert werden. (Border WA et al., 1994; Gressner AM et al., 1996)

Auch im Prostatakarzinom sind tumorassoziierte Myofibroblasten eine Quelle für Signale, die dessen Tumorigenität steigern. So konnte zum Beispiel mittels Cokultur-Systemen gezeigt werden, dass durch die Kombination von immortalisierten, primär nicht tumorigenen Prostatazelllinien mit CAFs die Formation und das Wachstum von Tumoren möglich wird. (Barclay WW et al., 2005; Olumi AF et al., 1999) In Xenograft-Mausmodellen wurde durch Zugabe von extrazellulären Matrixkomponenten in Form von Matrigel und stromalen Zellen zu niedrigmalignen Prostatakarzinomzellen ein Anstieg der Tumorformation von acht auf 100% erreicht. (Tuxhorn JA et al, 2002a) Ferner konnte durch Coinjektion von PC-3-Zellen und tumorigenen Prostatafibroblasten in Nacktmäuse die Latenz bis zur Ausbildung von Tumoren verkürzt werden. Gleichzeitig wurde die Entwicklung eines Tumors häufiger beobachtet. (Camps JL et al., 1990) In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass durch die zusätzliche Applikation von Fibroblasten die zur Induktion einer Tumorbildung notwendige Zellzahl drastisch gesenkt werden kann. (Picard O et al., 1986)

Bei der Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten für das Prostatakarzinom reicht es folglich nicht aus, sich unter einem Tumor eine isolierte Masse autonom proliferierender Tumorepithelzellen vorzustellen. Stattdessen muss er im Kontext mit dem ihn umgebenden Stroma betrachtet werden, da zahlreiche Eigenschaften des Prostatakarzinoms Resultat vielfältiger Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen und Tumormicroenvironment sind. (Corn PG, 2012) Paget postulierte bereits vor über 100 Jahren, dass Therapieregime, deren Ziel es ist, Tumorzellen direkt abzutöten zwar durchaus sinnvoll sind und ihre Berechtigung haben, dass es aber auf der anderen Seite ebenso wichtig ist, Strategien zu entwickeln, das

Tumormicroenvironment zu modifizieren, um auf diese Weise den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. (Paget S, 1989)

Bevor neue Medikamente für die Anwendung am Menschen zugelassen werden, muss im Rahmen präklinischer Studien deren Effektivität, Toxizität und Sicherheit untersucht werden. Hierfür werden, wie generell bei in vitro Experimenten, klassischerweise zweidimensionale Zellkultursysteme verwendet, bei denen die Zellen als Monolayer adhärent auf dem Boden von Zellkulturgefäßen wachsen. Zweidimensionale Zellkultursysteme sind jedoch nicht in der Lage, die natürlichen Verhältnisse in vivo realitätsnah nachzubilden. Wie oben erwähnt bestehen Gewebe und Organe nicht aus einer einzigen Zellart, sondern stellen komplexe Strukturen dar, in denen unterschiedliche Zelltypen untereinander und mit Gefäßen, Nerven und umliegendem Stroma interagieren. Diese vielschichtigen Wechselwirkungen werden erst durch den dreidimensionalen Aufbau der Organe ermöglicht. (Fennema E et al., 2013)

Zellkultursysteme, mit deren Hilfe die Zytoarchitektur und die Wachstumsbedingungen im differenzierten Gewebe bzw. Organ in vitro simuliert werden, werden als histiotypische oder organotypische Zellkultur bezeichnet. (Lindl T et al., 2008)

Sphäroide stellen die gebräuchlichste und vielseitigste Methode der dreidimensionalen Zellkultur dar. Dabei handelt es sich um kleine, dreidimensionale Zellaggregate, die nicht fest an ihrer Kulturunterlage verankert sind. Sphäroide können aus Zellsuspensionen auf vielfältige Art und Weise generiert werden. Alle Methoden basieren auf dem Grundprinzip, durch geeignete Maßnahmen ein adhärentes Wachstum der Zellen auf dem Boden des Zellkulturgefäßes zu verhindern. Dadurch überwiegen Zell-Zell-Interaktionen gegenüber Zell-Matrix-Interaktionen und die Zellen aggregieren spontan und selbstständig zu Sphäroiden. Entscheidende physiologische Eigenschaften der natürlichen Verhältnisse in vivo können mittels Sphäroiden in vitro imitiert werden. Hierzu gehören die Bildung und Ablagerung einer eigenen extrazellulären Matrix sowie die komplexe, dreidimensionale Zytoarchitektur, durch die Zell-Zell-Interaktionen möglich werden. (Mehta G et al., 2012) Dadurch kann das Tumormicroenvironment akkurater in vitro reproduziert werden, als dies durch konventionelle zweidimensionale Zellkultursysteme möglich ist. (Friedrich J et al., 2007a)

Zellen, die als Sphäroide kultiviert werden verhalten sich grundlegend anders als im zweidimensionalen Monolayer. Für die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP konnte gezeigt werden, dass es deutliche Unterschiede bezüglich der Genexpression zwischen Monolayern und Sphäroiden gibt. Im Vergleich zu soliden Tumoren der gleichen Zelllinie in Mäusen

wurde für die Monolayerkultur ebenfalls eine deutlich aberrante Genexpression nachgewiesen, während große Ähnlichkeit zwischen Xenograft-Mausmodell und Sphäroiden bestand. LNCaP-Sphäroide besaßen folglich gewebeähnliche Eigenschaften, welche sich auch im Aufbau der Sphäroide widerspiegelten. In Analogie zu nicht vaskularisierten Tumoren in vivo wiesen die LNCaP-Sphäroide ab einer gewissen Größe eine zonale Architektur auf. Proliferierende Zellen fanden sich nur außen, während das Zentrum nekrotisch war. (Takagi A et al., 2007) Diese Organisation ist ab einer Größe von 400 – 500µm typisch für Sphäroide, wobei sich zwischen den beiden genannten Zonen häufig noch eine Zone ruhender Zellen findet. (Kunz-Schughart LA et al., 2004) Erklärt werden kann dies durch ihre komplexe, dreidimensionale Struktur, durch die Barrieren für Stofftransporte entstehen. Da das Diffusionslimit für die meisten Moleküle, vor allem auch Sauerstoff, innerhalb der Sphäroide ca. 150 – 200 µm beträgt, kann es im Zentrum großer Sphäroide leicht zu einer Hypoxie mit konsekutiver Nekrose kommen. (Mehta G et al., 2012)

Auch Medikamente müssen im Körper zahlreiche Barrieren passieren, um bis zu ihrem eigentlichen Wirkort zu gelangen. Dieser Sachverhalt kann durch die limitierte Diffusionsstrecke innerhalb der Sphäroide nachgeahmt werden. In Sphäroiden ist ähnlich wie in vivo die Penetration des Pharmakons bis zu den Zielzellen derjenige Schritt, der am wichtigsten für dessen Wirksamkeit ist. Zahlreiche Chemotherapeutika erzielen nur in oberflächlichen Zellschichten wirksame Spiegel und sind nicht in der Lage bis in die Tiefe der Sphäroide vorzudringen. (Kostarelos K et al., 2005) Dies ist der Hauptgrund für die erhöhte Resistenz von Tumorzellen gegen die meisten Chemotherapeutika, wenn sie als Sphäroide kultiviert werden. (Torisawa Y-S et al., 2005) Desweiteren kann nach erstmaliger Applikation eines Chemotherapeutikums die äußerste Zellschicht der Sphäroide nekrotisch werden, während in ihrem Inneren vitale Zellen übrig bleiben. Die äußere Hülle nekrotischer Zellen stellt eine zusätzliche Barriere dar und verhindert bei erneuter Medikamentenexposition das weitere Vordringen des Wirkstoffes zu den noch vitalen Zellen im Inneren der Sphäroide. (Mehta G et al., 2012) Die meisten Chemotherapeutika entfalten ihre Wirkung gegen stark proliferierende Zellen. Ruhende Zellen mit nur geringer mitotischer Aktivität, zu denen auch Krebsstammzellen gehören, werden hingegen deutlich schlechter abgetötet. Die Resistenz gegen Chemotherapeutika und die Entwicklung von Tumorrezidiven wird mit Krebsstammzellen in Verbindung gebracht. (Härmä, V et al., 2010) Ein anderer zentraler Mechanismus, der zur reduzierten Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie oder Chemotherapeutika führt ist die Hypoxie. (Tannock I, 1976) Beides kann durch den Sauerstoffgradienten innerhalb von Sphäroiden, welcher zu deren typischem

zonalen Aufbau führt, in vitro simuliert werden. (Andre F et al., 2010; Hirschhaeuser F et al., 2010, Shekhar MPV, 2011) Sphäroide stellen daher im Vergleich zu Monolayern eine physiologischere Plattform dar, um die Wirkung von Pharmaka in vitro zu erforschen und sollten daher die zweidimensionale Zellkultur ablösen.

2.5 Ziele der Arbeit

Hauptziel dieser Arbeit war es, die zytotoxische Wirkung der Zoledronsäure und zweier Nanomodifikationen auf dreidimensionale Prostatakarzinomsphäroide zu untersuchen. Im Zuge dessen sollten sowohl für das zwei- als auch das dreidimensionale Zellkultursystem folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann durch die beiden verwendeten Nanomodifikationen das zytotoxische Potenzial der freien Zoledronsäure gegen Prostatakarzinomzellen gesteigert werden?
2. Welches sind die grundlegenden Wirkmechanismen der einzelnen Substanzen?
3. Welchen Effekt haben die Testsubstanzen auf tumorassoziierte Fibroblasten?
4. In wie weit beeinflussen Komponenten des Tumormicroenvironments wie tumorassoziierte Fibroblasten und die dreidimensionale Zytoarchitektur innerhalb der Sphäroide die Effizienz der Testsubstanzen gegen Prostatakarzinomzellen?

3. Material und Methodik

3.1 Zellkulturbedarf

Tab. 3.1 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

| Produkt | Bestellnummer | Hersteller |
|--|---------------|--|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | D5796 | Sigma |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 mit Phenolrot | R8785 | Sigma |
| Fetales Kälberserum (FCS) | F7524 | Sigma |
| Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (hi-FCS) | | Eigene Herstellung aus FCS der Firma Sigma F7524 |
| Non essential Amino Acids (NEA) | M7145 | Sigma |
| Penicillin/Streptomycin | P4333 | Sigma |
| Trypsin/EDTA | T3924 | Sigma |
| Phosphate buffered saline (PBS) | D8537 | Sigma |
| Zellkulturflaschen 25cm ² Falcon (venty) | 3108 | Becton Dickinson |
| 96 Well Mikrotiterplatte | 3072 | Becton Dickinson |
| Cell Proliferation Reagent WST-1-Kit | 11644807001 | Roche Diagnostics |
| BrdU ELISA colorimetric | 11647229001 | Roche Diagnostics |
| Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} LDH | 1644793 | Roche Diagnostics |
| Cell Death Detection Plus Kit | 1774425 | Roche Diagnostics |

3.2 Geräte

Tab. 3.2 Übersicht der verwendeten Geräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|------------------|--------------------|----------------------|
| Sterile Werkbank | HERA Safe | Heraeus Holding GmbH |
| Pipettierhilfe | IBS Pipetboy | Integra Biosciences |
| ELISA Reader | Infinite F 200 PRO | Tecan |
| Umkehrmikroskop | Axiovert S 100 | Zeiss |
| Vakuumpumpe | Kendro Vakusafe | Kendro |
| Brutschrank | HERAcell | Heraeus Holding GmbH |
| Zentrifuge | Centrifuge 5804 | Eppendorf |

3.3 Zellkultur

Die gesamte Zellkultur erfolgte bis auf wenige, explizit genannte Ausnahmen unter sterilen Kautelen an der HERA Safe Werkbank. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25cm^2 in 4,5ml Zellkulturmedium kultiviert und bei 37° Celsius und 90%iger Luftfeuchtigkeit unter 5%iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert.

3.3.1 Zelllinien

PC-3

Tab. 3.3 Charakterisierung der Zelllinie PC-3

| | |
|--|---|
| Morphologie | Epithelial |
| Zelltyp | Humanes Prostatakarzinom |
| Herkunft | Post mortem Primärkultur aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen Kaukasiers mit Grad IV Adenokarzinom nach Androgenentzugstherapie |
| Erscheinungsjahr | 1979 |
| Populationsverdopplungszeit [h] | ca. 50 |
| Kultureigenschaften | Adhärent |
| Androgensensitivität | Nein |
| Basismedium | DMEM |
| Mediumzusätze | 1% NEA; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FCS |

DU 145

Tab. 3.4 Charakterisierung der Zelllinie DU 145

| | |
|--|--|
| Morphologie | Epithelial |
| Zelltyp | Humanes Prostatakarzinom |
| Herkunft | Isoliert aus einer Gehirnmastase eines 69-jährigen Kaukasiers mit Prostatakarzinom |
| Erscheinungsjahr | 1975 |
| Populationsverdopplungszeit [h] | ca. 30 – 40 |
| Kultureigenschaften | Adhärent |
| Androgensensitivität | Nein |
| Basismedium | RPMI Medium 1640 mit Phenolrot |
| Mediumzusätze | 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FCS |

LNCaP

Tab. 3.5 Charakterisierung der Zelllinie LNCaP

| | |
|--|--|
| Morphologie | Epithelial |
| Zelltyp | Humanes Prostatakarzinom |
| Herkunft | Isoliert durch Feinnadelaspiration aus einer links supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Kaukasiers mit metastasiertem Prostatakarzinom |
| Erscheinungsjahr | 1977 |
| Populationsverdopplungszeit [h] | ca. 60 |
| Kultureigenschaften | Adhärent |
| Androgensensitivität | Ja |
| Basismedium | RPMI Medium 1640 mit Phenolrot |
| Mediumzusätze | 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FCS |

Fibroblasten

Verwendet wurden Primärkulturen von Fibroblasten, welche von Prostatakarzinompatienten stammten, die in der Klinik für Urologie und Kinderurologie in Homburg radikal prostatektomiert wurden. Pro Patient wurden zwei korrespondierende Pärchen von Primärkulturen angelegt, deren Fibroblasten zum einen aus der tumortragenden Region der Prostata gewonnen wurden (PTF), während die anderen aus einem tumorfreien Bezirk des gleichen Resektates entnommen wurden (PNF). Die tumorhaltigen bzw. -freien Bereiche der Prostatektomiepräparate wurden histologisch durch die Pathologie der Universität des Saarlandes identifiziert. Kultiviert wurden die Zellen in DMEM mit Zusatz von 1% NEA, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS.

3.3.2 Mediumwechsel bei adhärenenten Zellen

Um eine gleichbleibende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten und potenziell toxische Stoffwechselprodukte aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen, wurde in regelmäßigen Abständen von ca. 48h das Zellkulturmedium gewechselt. Hierbei hat sich ein Turnus von Montag, Mittwoch, Freitag bewährt. Bei entsprechender Indikation, wie zum Beispiel Verfärbung des im Medium enthaltenen und als Indikator dienenden Phenolrotes, wurden auch außerhalb dieses Schemas Medienwechsel durchgeführt. Das verbrauchte Nährmedium wurde restlos aus der Zellkulturflasche abgesaugt und mittels steriler Einmalpipette und Pipettierhilfe durch frisches, komplettiertes Medium ersetzt.

3.3.3 Passagieren von adhärenenten Zellen

Um Zellen von ihrer Wachstumsfläche im Zellkulturgefäß und aus ihrem Verband im Monolayer zu lösen, wurden diese nach Entfernung des Zellkulturüberstandes und Zugabe von 2ml einfach konzentriertem Trypsin-EDTA für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Zellsuspensionen wurden anschließend in Zentrifugenröhrchen, in die 1ml FCS-haltiges Zellkulturmedium zwecks Inaktivierung des zytotoxischen Trypsins vorgelegt wurde, überführt und drei Minuten bei 1100rpm zentrifugiert. Mittels Glaspasteurpipette und Vakuumsaugpumpe wurde der sich über dem beim Zentrifugieren entstandenen Zellpellet befindliche Überstand inklusive etwaig vorhandener Luftblasen restlos abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mittels steriler Einmalpipette und Pipettierhilfe in 1ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und standen zur Zellzählung und Durchführung neuer Experimente oder zur erneuten Aussaat in Zellkulturflaschen zur Verfügung.

3.3.4 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Für die Berechnung der Zellzahl innerhalb einer Zellsuspension wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Der Raum zwischen Deckglas und Mittelsteg der Zählkammer wurde mit der homogen durchmischten Zellsuspension gefüllt. Anschließend wurden die Zellen in den vier großen, durch Dreifachlinien begrenzten Eckquadraten des Gitternetzes mäanderförmig bei vierzigfacher Vergrößerung gezählt. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurden bei randständigen Zellen lediglich die Zellen auf der oberen und linken Dreifachlinie des Gitternetzes berücksichtigt. Aus der Summe der Zellzahlen innerhalb der vier Eckquadrate wurde der Mittelwert berechnet, welcher der Zellzahl innerhalb 0,1µl der Zellsuspension entsprach, da jedes Eckquadrat eine Fläche von 1mm² aufweist und der Abstand zwischen Mittelsteg und Deckglas genau 0,1mm beträgt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ erhielt man die Zellzahl in 1ml Zellsuspension. Die für die Durchführung eines bestimmten Experimentes benötigte Menge an Zellsuspension konnte anschließend mittels folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Benötigte Menge an Zellsuspension} = \frac{\text{Gesamtvolumen an Zellsuspension} \times \text{benötigte Zellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

3.3.5 Herstellung von hitzeinaktiviertem FCS

Da in 1ml herkömmlichem FCS durchschnittlich bereits eine LDH-Aktivität von 864mU vorliegt, würde dessen Verwendung zu unerwünscht hohen Hintergrundwerten im Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} führen und die Ergebnisse dieses Assays verfälschen. Durch 30-minütiges Erhitzen von handelsüblichem FCS des Herstellers Sigma auf 56°C im Wasserbad konnte die im Serum enthaltene Laktatdehydrogenase (LDH) inaktiviert und somit deren Hintergrundwerte auf ein Minimum reduziert werden. Das abgekühlte hi-FCS konnte entweder sofort zur Komplettierung von Zellkulturmedien verwendet oder aber bei -20°C in entsprechend beschrifteten Zentrifugenröhrchen gelagert werden.

3.4 Zellkulturassays an Monolayer-Kulturen

Genereller Versuchsansatz

Sämtliche Assays wurden in 96 Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Im Vorfeld wurde die für die Beantwortung der jeweiligen Fragestellung notwendige Plattenbelegung ausgearbeitet und die für die Durchführung des Experimentes benötigte Zellzahl sowie die zum Beimpfen der Mikrotiterplatte benötigte Menge an Zellsuspension für jede Zelllinie berechnet. Gemessen wurden immer Triplicates, aus denen später der Mittelwert und die

Standardabweichung berechnet wurden. Als biologische Kontrolle wurden Dreifachwerte der entsprechenden Zelllinien mitgeführt, welche lediglich in reinem Zellkulturmedium ohne Zusatz von Testsubstanzen kultiviert wurden. Je nach Assay mussten darüber hinaus Triplicates für weitere Kontrollen mit eingeplant werden. Zur Bestimmung der Hintergrundabsorptionswerte, welche durch das im Zellkulturmedium enthaltene Phenolrot oder durch Färbung der Reaktionslösungen zustande kommen, wurden bei jedem Experiment Dreifachwerte der mit den Reaktionslösungen versetzten Zellkulturmedien mit gemessen. Die Mittelwerte dieser auch als „Blanks“ bezeichneten Triplicates wurden von allen übrigen Absorptionswerten abgezogen. Da sich am Außenrand der 96 Well Mikrotiterplatten Verdunstungsprozesse abspielen können, welche das Wachstum und die Viabilität der Zellen ungewollt beeinflussen können, wurden die äußeren 36 Wells stets nur mit 200µl beliebigem Zellkulturmedium ohne Zellen gefüllt. Gleichzeitig sollten hierdurch Verdunstungsprozesse im Innern der Platte minimiert werden. Die für die Blanks vorgesehenen Wells wurden mit je 200µl entsprechendem Medium gefüllt. Anschließend wurden die für das Experiment benötigten Zellen abtrypsiniert und eine Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die gewünschte Zellzahl pro Well der Mikrotiterplatte wurde zunächst in einem Volumen von 100µl vorgelegt und die Zellen für 24h im Brutschrank inkubiert, bevor am Folgetag 100µl reines Medium bzw. 100µl Medium versetzt mit der zu testenden Substanz in gewünschter Konzentration zugefügt wurden. Das Endvolumen, in dem die Zellen kultiviert wurden, betrug somit 200µl. Während der Inkubationszeit wurden die Mikrotiterplatten täglich unter dem Umkehrmikroskop begutachtet und die Befunde protokolliert. Der Assay wurde nach unterschiedlichen Zeitintervallen, in der Regel jedoch vier bis fünf Tage nach Substanzzugabe durchgeführt.

Die Substratreaktion wurde - individuell für jedes Experiment - nach unterschiedlichen Zeitintervallen gestoppt, sobald eine für die photometrische Auswertung des Zellkulturassays ausreichend starke Farbreaktion eingetreten war. Im Falle des nicht gestoppten WST-1 Assays wurde für die Auswertung des Experimentes ein Zeitpunkt gewählt, zu dem die Absorptionswerte der relevanten Wells zwischen 1 und 3 lagen. Alle Absorptionswerte wurden mit dem Tecan ELISA-Reader bei der für den jeweiligen Assay vorgeschriebenen Wellenlänge und Referenzwellenlänge gemäß einem einheitlichen Schema spektrophotometrisch gemessen. Nach Entfernung des Deckels wurden die Mikrotiterplatten im Reader zunächst für sieben Sekunden geschüttelt, um eine optimale Durchmischung der Reaktionspartner zu gewährleisten. Die eigentliche Messung begann nach einer

programmierten Wartezeit von drei Sekunden, wobei die Anzahl der Lichtblitze pro Well auf fünf festgelegt wurde.

Cell Proliferation Reagent WST-1

Die Zell-Viabilität und –proliferation wurde mit Hilfe des Cell Proliferation Reagent WST-1 bestimmt. Das Wirkprinzip dieses Assays beruht auf der Spaltung eines stabilen Tetrazoliumsalzes zu löslichem Formazan, welches spektrophotometrisch nachgewiesen werden kann. Die dafür benötigten Reduktionsäquivalente NADH bzw. NADPH werden je nach glykolytischer Aktivität der Zellen durch einen vor allem an ihrer Oberfläche stattfindenden biochemischen Prozess zur Verfügung gestellt und korrelieren somit mit der Zellzahl bzw. Zellviabilität.

Vier bis fünf Tage nach Substanzzugabe wurde der WST-1 Assay durchgeführt. Da die Haltbarkeit des gebrauchsfertig mitgelieferten Reagenz bei Zimmertemperatur begrenzt ist, wurde dieses, in 1ml Portionen aliquotiert, bei -20°C gelagert und das benötigte Quantum erst unmittelbar vor Versuchsdurchführung aufgetaut. In jedes Well wurden 10% des darin enthaltenen Volumens WST-1 Reagenz mittels Combitip pipettiert, woran sich eine sofortige Nullpunktmessung bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 620nm anschloss. Weitere Messungen wurden in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Farbreaktion im Abstand von 15 bis 30 Minuten durchgeführt. Nach Beendigung jeder spektrophotometrischen Messung wurden die Mikrotiterplatten schnellstmöglich im Brutschrank weiter inkubiert. Gestoppt wurde die Messung in der Regel nach 120 Minuten bzw. sobald die Absorptionswerte einzelner Wells nicht mehr gemessen werden konnten.

BrdU ELISA colorimetric

Der BrdU stellt einen hoch spezifischen, nichtradioaktiven Immunoassay dar, mit dessen Hilfe Zellproliferation nachgewiesen werden kann.

Vier bis fünf Tage nach Zugabe der Testsubstanzen wurden in jedes Well der Mikrotiterplatte 20µl BrdU labeling solution pipettiert und die Zellen für weitere 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser ersten Inkubationsphase wurden die im Zuge der Zellproliferation neu gebildeten DNA-Einzelstränge durch Einbau des Thymidinanalogs 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin markiert. Um einen weiteren Einbau von BrdU in die DNA zu verhindern, wurde nach Ablauf der Inkubationszeit die labeling solution durch Ausklopfen der Mikrotiterplatten restlos aus den Wells entfernt. An dieser Stelle des

Versuchsablaufes bot sich die Möglichkeit, den Assay zu unterbrechen und seine endgültige Auswertung auf einen späteren Zeitpunkt zu verschieben. Dazu wurde die ausgeklopfte Mikrotiterplatte mit geöffnetem Deckel auf einer auf 60°C vorgeheizten Heizplatte 15 Minuten getrocknet, anschließend verschlossen und mittels eines Folienschweißgerätes evakuiert. Die so verpackten Mikrotiterplatten konnten im Kühlschrank bei 8°C maximal sieben Tage lang gelagert werden und wurden vor ihrer weiteren Verwendung zunächst 30 Minuten lang unter der sterilen Werkbank auf Raumtemperatur gebracht. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden, unabhängig davon, ob der Assay unterbrochen wurde oder nicht, in exakt gleicher Weise durchgeführt. Zwecks Fixierung der Zellen auf dem Boden der Wells und Denaturierung ihrer DNA wurden in die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte 200µl der gebrauchsfertigen Reaktionslösung FixDenat pipettiert, welche nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch erneutes Ausklopfen der Platte wieder entfernt wurde. Anschließend wurde in jedes Well 100µl anti-BrdU-POD-working solution pipettiert. Diese unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch anzusetzende Lösung enthält einen Antikörper gegen BrdU, welcher mit einer Peroxidase gekoppelt ist, die das in der substrate solution enthaltene Tetramethyl-Benzidin spalten kann und somit zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag führt. Nach 90 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte erneut ausgeklopft und jedes Well dreimal hintereinander mit 250µl washing solution gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nach jedem Waschschrift wurde die Mikrotiterplatte sorgfältig ausgeklopft. Durch Zugabe von 100µl substrate solution pro Well wurde die photometrisch messbare Farbreaktion gestartet, welche nach ausreichender Farbentwicklung unter Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe von 25µl 1M Schwefelsäure gestoppt wurde. Bevor die Absorptionswerte bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 620nm gemessen wurden, wurde der Inhalt der Mikrotiterplatten eine Minute lang bei 300rpm auf der Schüttelplatte durchmischt. Um eine potenzielle Interaktion zwischen anti-BrdU-Antikörpern und Zellbestandteilen zu überprüfen, liefen neben den standardmäßig durchgeführten Blanks weitere Kontrollen mit. Hierbei handelte es sich um Wells, in denen Zellen in gleicher Zahl, jedoch ohne Zugabe von BrdU labeling solution inkubiert wurden. Ansonsten wurden diese Wells identisch behandelt wie die der mit BrdU markierten Zellen.

Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Apoptose wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (CDD⁺) nachgewiesen. Dieser Sandwich-Enzym-Immunoassay ist in der Lage, die Histonekomponente von

Nucleosomen über einen murinen, monoklonalen Anti-Histone-Biotin Antikörper zu erkennen und diesen Immunkomplex auf speziellen, mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten zu binden. Dadurch werden die Nucleosomen fixiert und den folgenden Reaktionsschritten zugänglich gemacht. Die photometrisch gemessene Farbreaktion wird durch eine Peroxidase katalysiert, die an einen zweiten murinen, monoklonalen Antikörper gekoppelt ist. Dieser ist gegen die DNA-Komponente der Nucleosomen gerichtet. Durchgeführt wird der Assay mit Lysaten behandelte bzw. unbehandelte Zellen.

Nach Entfernung des Zellkulturmediums durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte wurden die Zellen durch Zugabe von 200µl Lyse-Puffer pro Well lysiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Mikrotiterplatten 10 Minuten lang bei 900rpm zentrifugiert. Mit der Multikanalpipette wurden anschließend 20µl Überstand aus den jeweiligen Wells in die mitgelieferten, mit Streptavidin beschichteten Wells überführt. Zusätzlich zu dem als Negativkontrolle dienenden Lysat nicht behandelte Zellen wurden 20µl der mit destilliertem Wasser rekonstituierten Positivkontrolle sowie 20µl Incubation-Buffer als Hintergrundkontrolle auf entsprechende Streptavidin beschichtete Wells pipettiert. Zu den vorgelegten Lysaten bzw. Kontrollen wurden 78µl des nach Anleitung angesetzten Immunoreagent, welcher die beiden Antikörper gegen die Histonproteine bzw. die DNA-Fragmente enthält, pipettiert. Die Wells wurden mit der im Test-Kit enthaltenen Folie abgedeckt und für 2 Stunden auf einer Rüttelplatte bei 300rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Platte ausgeklopft und sämtliche ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Spülen der Wells mit jeweils 250µl Incubation-Buffer entfernt. Nach jedem Waschschrift wurde die Platte sorgfältig ausgeklopft. Nach Zugabe von 100µl ABTS solution pro Well wurde die Mikrotiterplatte auf der Rüttelplatte solange bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine ausreichend starke Farbreaktion eingetreten war. Hierbei wurde bisweilen in Abhängigkeit von der Intensität der Farbreaktion die angegebene Inkubationszeit von 10 bis 20 Minuten unterschritten und die enzymatische Reaktion vorzeitig durch Zugabe von 100µl ABTS stop solution beendet. Die photometrische Messung erfolgte bei 405nm mit einer Referenzwellenlänge von 490nm.

Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}

Der Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH⁺) ist ein nichtradioaktiver, spektrophotometrischer Assay, mit dessen Hilfe Nekrose nachgewiesen werden kann. Im Zuge von Nekrose kommt es zu einem Verlust der Zellmembranintegrität mit konsekutiver Freisetzung intrazellulär lokalisierter Enzyme. Hierzu gehört auch die LDH, ein Enzym der Glykolyse, welches Laktat

unter Bildung von NADH/H^+ zu Pyruvat oxidiert. Der Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} erlaubt durch eine indirekte Messung der enzymatischen Aktivität der LDH in Zellkulturüberständen Rückschlüsse auf nekrotischen Zelluntergang. Für die Reduktion des im Reaction mixture enthaltenen Tetrazoliumsalzes Iodtetrazoliumchlorid zu Formazan durch den Katalysator Diaphorase ist das bei der Oxidation von Laktat zu Pyruvat entstandene NADH/H^+ notwendig, dessen Konzentration proportional zur Aktivität der freigesetzten LDH ist.

Unter der Annahme, dass jede Zelle einer bestimmten Zelllinie annähernd die gleiche Konzentration an LDH enthält, kann dieser Assay alternativ auch angewendet werden, um nach gezielter Freisetzung von LDH aus Zellen durch Lyse Zellproliferation bzw. Zellzahlen zu bestimmen.

Für die gesamte Zellkultur wurden ausschließlich mit hi-FCS komplettierte Medien verwendet. Zusätzlich zu der beim LDH⁺ auch als „low control“ bezeichneten biologischen Kontrolle und den standardmäßig durchgeführten Blanks wurde eine sogenannte „high control“ mitgeführt. Diese entspricht in ihrem Ansatz der biologischen Kontrolle, deren Zellen zu Beginn des Assays jedoch mit Hilfe des im Test-Kit enthaltenen Lyse-Reagenzes lysiert werden, um die maximal mögliche LDH-Freisetzung zu simulieren. Um eine potentielle Interaktion der verwendeten Testsubstanzen mit dem Assay auszuschließen, wurden Substanzkontrollen mit durchgeführt.

Die Zellen der high control und der Substanzkontrolle wurden durch Zugabe von 10µl Lyse-Reagenz und anschließender 15-minütiger Inkubation im Brutschrank lysiert. Danach war kein steriles Arbeiten mehr nötig. 100µl Überstand aus jedem Well wurden in identischer Plattenbelegung auf eine neue Mikrotiterplatte überführt. Nur bei der Substanzkontrolle wurden 90µl Überstand mit 10µl der Testsubstanz versetzt. Die Endkonzentration entsprach hierbei der der behandelten Zellen. Zu den Überständen wurden 100µl der unmittelbar vor Verwendung nach Gebrauchsanleitung angesetzten Reaction mixture pipettiert. Hierzu wurden pro 96 Well Mikrotiterplatte 250µl Catalyst mit 11,25ml Dye solution versetzt. Nach 5- bis 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl Stop solution beendet. Gemessen wurden die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 492nm mit einer Referenzwellenlänge von 620nm.

3.5 Sphäroide

Da ein möglichst physiologisches Zellkultursystem in vitro angestrebt wurde, mit dessen Hilfe Eigenschaften des Tumormicroenvironments realitätsnaher, als dies mittels

zweidimensionaler Zellkultur möglich ist, nachgeahmt werden sollten, wurden dreidimensionale Sphäroide aus Prostatakarzinomzellen generiert.

3.5.1 Beschichten von 96 Well Mikrotiterplatten mit 2%iger Agarose

Um die Ausbildung von Zell-Matrix-Verbindungen zu unterdrücken und somit die Entstehung eines adhärenenten Zellrasens zu verhindern, wurden 96 Well Mikrotiterplatten pro Well mit 50µl 2%iger Agarose beschichtet.

Unter der sterilen Werkbank wurde eine Heizplatte auf 90°C vorgeheizt, auf der die zu beschichtenden Mikrotiterplatten sowie ein steriles Wännchen für die Agarose vorgewärmt wurden. 750mg Agarose wurden in einem autoklavierten Erlenmeyerkolben mit 50ml FCS-freiem Basismedium gemischt und mit Alufolie verschlossen. Nach Entfernung des Alufoliendeckels wurde die Agarose in der Mikrowelle dreimal aufgekocht, um eine vollständige Lösung der Agarose im Basismedium zu erreichen. Hierbei hat sich ein Rhythmus von 3x3 Minuten bei 180W bewährt. Um ein Überkochen der Agarose zu verhindern, wurde die Mikrowelle nach dem dritten Aufkochen der Agarose gegebenenfalls auch vor Ablauf der vollen letzten drei Minuten ausgeschaltet. Der mit Alufolie verschlossene Erlenmeyerkolben wurde, um Wärmeverluste so gering wie möglich zu halten und ein Abkühlen der heißen Agarose zu verhindern, in einer Styroporbox mit heißem Wasserbad zurück zur Werkbank transportiert. Die heiße Agarose wurde in das vorgewärmte sterile Wännchen gegossen und in jedes Well der Mikrotiterplatten wurden mittels Multikanalpipette 50µl Agarose pipettiert. Dabei entstandene Luftblasen wurden mit vorbereiteten sterilen Kanülen zerstoßen, da diese einen störenden Einfluss auf die Sphäroidbildung ausüben können. Die fertig beschichteten Mikrotiterplatten wurden verschlossen, von der Heizplatte genommen und 30 Minuten lang auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach konnten sie entweder sofort für Experimente verwendet oder aber eingeschweißt und im Kühlschrank bei 8°C bis zu einer Woche lang gelagert werden.

3.5.2 Kultivierung von Sphäroiden in 96 Well Mikrotiterplatten

Um den Zellen die Möglichkeit zu geben, sich nach Aussaat der Schwerkraft folgend am Boden der beschichteten Wells zu sammeln und sich dort zu multizellulären Aggregaten zusammen zu lagern, erfolgte die Substanzzugabe erst nach 48 bzw. 72 statt 24 Stunden. Im Gegensatz zur zweidimensionalen Zellkultur wurden die Zellen darüber hinaus initial bereits in 150µl Zellkulturmedium ausgesät und später lediglich 50µl Medium bzw. Mediumsubstanzgemisch zugefügt. Dadurch sollten starke Flüssigkeitsbewegungen in den Wells vermieden werden, welche sonst möglicherweise die Sphäroidformation gestört bzw.

im ungünstigsten Fall zu einer erneuten Vereinzelung der bereits aggregierten Zellen geführt hätten. Initial ausgesät wurden 5×10^3 Zellen. Die Formierung und das Wachstum der Sphäroide wurden täglich unter dem Umkehrmikroskop überprüft und die Größe der Sphäroide mittels einer im Okular eingebauten Messskala vermessen und protokolliert. Um zusätzlich zu der dreidimensionalen Organarchitektur auch die Wechselwirkungen zwischen Prostatakarzinomzellen und umgebendem Tumormicroenvironment zu simulieren, wurden Prostatakarzinomzellen nicht nur allein als Homosphäroide sondern auch zusammen mit tumorassoziierten Fibroblasten als Heterosphäroide kultiviert. Dazu wurden die Prostatakarzinomzellen zeitgleich mit den aus Primärkulturen stammenden tumorassoziierten Fibroblasten aus der tumortragenden Region eines Prostatakarzinompatienten (PTF 54) im Verhältnis 1:1 in den Wells einer 96 Well Mikrotiterplatte ausgesät. Die Gesamtzellzahl lag auch hier bei 5×10^3 Zellen.

3.5.3 Zellkulturassays an 3D-Sphäroidkulturen

Da die Zellzahl innerhalb von Sphäroiden stärker variiert als bei vergleichbaren Monolayern und die Anzahl messbarer Proben angesichts hoher Assaykosten limitiert ist, wurden immer Fünffachwerte methodischer Duplicates photometrisch gemessen. Dazu wurde das Probenmaterial zweier identisch angesetzter und behandelter Sphäroide zu gleichen Teilen gemischt und das zur Durchführung des Assays notwendige Volumen dieser Mischung entnommen. Es wurden die gleichen Zellkulturassays wie in der Flatkultur, jedoch in an die Gegebenheiten der Sphäroidkultur angepasster Form, durchgeführt. Die Auswertung der Assays erfolgte vier bis fünf Tage nach Substanzzugabe.

Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Nach Entfernung von 100 µl Kulturüberstand wurden in jedes Well der Mikrotiterplatte 150 µl der mitgelieferten lysis solution pipettiert. Die erfolgreiche Zelllyse wurde nach einer 60-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur unter dem Umkehrmikroskop kontrolliert. Während der Inkubationszeit wurden die Sphäroide alle 15 Minuten mit der Multikanalpipette resuspendiert, um die Zellen aus ihrem dreidimensionalen Verband herauszulösen und somit dem Lysereagenz zugänglich zu machen. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten 10 Minuten lang bei 900rpm zentrifugiert und jeweils 50 µl Überstand von korrespondierenden Pärchen identisch kultivierter Sphäroide gleicher Zelllinie auf eine neue 96 Well Mikrotiterplatte transferiert. 20 µl dieser methodischen Duplicates wurden in die mitgelieferten und mit Streptavidin beschichteten Wells überführt. Ferner wurde ein Triplicate aus je 20 µl Incubation-Buffer als Hintergrundkontrolle vorgelegt. Danach wurde der Assay in

Analogie zum bereits für die 2D-Kultur beschriebenen Prozedere fortgesetzt, wobei die Zeit bis zur Beendigung der Farbreaktion durch Zugabe der ABTS Stop solution protokolliert wurde.

Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}

Der LDH⁺-Assay wurde in der 3D-Kultur sowohl zum Nachweis von Nekrose als auch zur Quantifizierung der Zellproliferation genutzt. Je nach Fragestellung musste die Durchführung des Assays modifiziert und an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden.

Nachweis von Nekrose

Zusätzlich zu der high control wurden beim ersten Mal auch bei den Sphäroiden zusätzliche Lysekontrollen durchgeführt, welche eine Interaktion der verwendeten Testsubstanzen mit dem Assay untersuchen sollten. Die Sphäroide der high control und der Substanzkontrollen wurden nach Zugabe von 10µl Lyseagenz pro Well für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert, wobei sie alle 10 Minuten mit der Multikanalpipette resuspendiert wurden. Hierdurch sollten die Sphäroide in Einzelzellen zerlegt werden, um somit die Voraussetzung zur vollständigen Lyse sämtlicher Zellen zu schaffen. Nach Verifizierung der vollständigen Lyse durch Betrachten unter dem Umkehrmikroskop wurden die Mikrotiterplatten drei Minuten lang bei 1100rpm zentrifugiert. 100µl Überstand aus jedem Well wurden als methodische Duplicates auf Wells einer neuen 96 Well Mikrotiterplatte transferiert. Von den dadurch entstandenen 200µl Überstandsgemisch der Duplicates wurden 100µl in Wells einer neuen 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert. Nur bei den Substanzkontrollen wurden lediglich 90µl transferiert, die mit 10µl der entsprechenden Substanz versetzt wurden. Die Konzentration wurde hierbei so gewählt, dass die Endkonzentration im Well der der zur Inkubation der Zellen verwendeten entsprach. Danach wurde der Assay wie bereits für die zweidimensionale Zellkultur beschrieben weiter ausgewertet. Die Zeit bis zur Zugabe der 50µl Stop solution wurde protokolliert und die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 492nm mit einer Referenzwellenlänge von 620nm durchgeführt.

Zellzahlbestimmung innerhalb der Sphäroide

Vorab wurden im zweidimensionalen Zellkultursystem aufsteigende Zellzahlen der unterschiedlichen Zelllinien in Kulturmedium mit hi-FCS drei Stunden nach Aussaat lysiert, um die Konzentration an freigesetzter LDH zu messen. Dazu wurden die Zellen in 100µl Zellkulturmedium ausgesät und drei Stunden später durch Zugabe von 5µl Lyseagenz und

15-minütige Inkubation im Brutschrank lysiert, bevor im Anschluss, wie für die zweidimensionale Zellkultur beschrieben, ein LDH⁺-Assay durchgeführt wurde. Anhand der Messwerte wurde für jede Zelllinie eine Eichkurve erstellt, indem die Menge an freigesetzter LDH in Abhängigkeit von der Zellzahl dargestellt wurde. Auf Grundlage dieser Messkurve wurde der LDH⁺-Assay zur Bestimmung der Zellzahl innerhalb von Sphäroiden modifiziert, um indirekt Rückschlüsse auf die Zellproliferation ziehen zu können. Das Grundprinzip beruhte darauf, durch eine gezielte Lyse aller vitalen Zellen die maximal mögliche Nekrose zu simulieren. Um die Hintergrundwerte an LDH im Kulturüberstand zu erfassen und somit die Messung einer falsch hohen Anzahl vitaler Zellen zu verhindern, wurden nach 3-minütigem Zentrifugieren der Mikrotiterplatten bei 1100rpm 100µl Überstand aus jedem Well in Form von methodischen Duplicates auf die Wells einer neuen 96 Well Mikrotiterplatte transferiert. Von den 200µl Überstandsgemisch wurden 100µl pro Well entfernt und die Mikrotiterplatte bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank aufbewahrt. In Analogie zum Prozedere bei der high control wurden sämtliche Sphäroide durch Zugabe von 5µl LDH⁺-Lysereagenz und 60-minütige Inkubation im Brutschrank lysiert. Auch hier wurde alle 10 Minuten mit der Multikanalpipette resuspendiert. Nach mikroskopisch gesicherter erfolgreicher Lyse wurden die Mikrotiterplatten drei Minuten bei 1100rpm zentrifugiert und anschließend jeweils 50µl Lysat als methodische Duplicates auf die Mikrotiterplatte mit den bereits vorgelegten Überständen pipettiert. Für das Generieren der Duplicates wurden hierbei die gleichen Wells herangezogen, welche schon bei den Überständen kombiniert wurden, so dass sich am Ende, neben Triplicates à 100µl der verwendeten hi-Medien als Blanks, Fünffachwerte für Überstand und Lysat korrespondierender Sphäroide à 100µl auf der Mikrotiterplatte befanden. Mit dieser Mikrotiterplatte wurde wie für die Monolayerkultur beschrieben ein LDH⁺-Assay durchgeführt. Nach Subtraktion der Mittelwerte der Blanks von allen anderen Werten wurden die Mittelwerte der Überstände von denen der korrespondierenden Lysate abgezogen. Von den dadurch erhaltenen Absorptionswerten konnte auf die Konzentration von aus vitalen Zellen freigesetzter LDH zurückgeschlossen werden.

3.6 Herstellung der Zoledronsäuremodifikationen

Die zur Herstellung der unterschiedlichen Zoledronsäuremodifikationen notwendigen Substanzen wurden - ebenso wie die Zoledronsäure selbst - von den italienischen Kooperationspartnern der Universität von Neapel in Form eines aus drei Phiolen bestehenden Kits zur Verfügung gestellt. Die genaue Zusammensetzung der in den einzelnen Phiolen enthaltenen Substanzen wurde aus urheberrechtlichen Gründen nicht offen gelegt. Anhand

eines mitgelieferten Standardprotokolls wurden die Modifikationen und die entsprechenden zoledronsäurefreien Kontrollpartikel unmittelbar vor Applikation frisch angesetzt. Gelagert wurden die Phiole A und B im Kühlschrank bei 4°C bzw. in einer Eisbox unter der sterilen Werkbank während des Ansetzens der entsprechenden Zoledronsäuremodifikationen. Der Inhalt von Phiole C wurde aliquotiert in Portionen à 100µl bei -20°C aufbewahrt. Tabelle 3.6 fasst den Inhalt der einzelnen Phiole zusammen.

Tab. 3.6 Übersicht des Inhaltes des Kits zur Herstellung der Zoledronsäuremodifikationen

| Phiole | Inhalt |
|--------|--|
| A | Nanopartikel auf Calciumphosphat-Basis |
| B | Wässrige Suspension von Liposomen |
| C | Wässrige Lösung 180mM Zoledronsäure in Puffer (5mg Zoledronsäure/100µl PBS pH 9,5) |

Herstellung von zoledronsäurehaltigen PEGylated nanoparticles (PLCaPZ NPs)

500µl der Nanopartikel aus Phiole A wurden in ein Eppendorf safe lock Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach Zugabe von 10µl Zoledronsäure aus Phiole C wurde der Inhalt 10 Sekunden lang gevortext. Anschließend ließ man das Eppendorf Reaktionsgefäß 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor man 510µl der Liposomensuspension aus Phiole B zugab, erneut für 10 Sekunden vortexte und die fertige Mixtur vor Anwendung 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen ließ. Die fertige Substanz enthielt Zoledronsäure in einer Konzentration von 0,49mg/ml.

Herstellung von zoledronsäurefreien PEGylated nanoparticles (PLCaP_ NPs)

Zur Herstellung dieser Nanopartikel, die als Bisphosphonat-freie Kontrollsubstanz zu den PLCaPZ NPs dienten, wurden 500µl Nanopartikel aus Phiole A mit 500µl Liposomensuspension aus Phiole B in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt, anschließend für 10 Sekunden gevortext und vor Gebrauch 10 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Herstellung von zoledronsäurehaltigen nanoparticles (LCaPZ NPs)

Im Unterschied zu den PEGylated nanoparticles wurden hier nur Nanopartikel aus Phiole A und Zoledronsäure aus Phiole C unter Verzicht auf Zugabe von Liposomensuspension miteinander gemischt. 10µl Zoledronsäure wurden zu 500µl Nanopartikeln in ein Eppendorf

Reaktionsgefäß pipettiert, anschließend für 10 Sekunden gevortext und vor Verwendung 10 Minuten lang bei Raumtemperatur gelagert. Durch den Verzicht auf Zugabe von Liposomen enthielten diese Nanopartikel mit 0,98mg/ml die doppelte Konzentration an Zoledronsäure, was bei den späteren Versuchsansätzen berücksichtigt werden musste.

Zoledronsäurefreie nanoparticles (LCaP_ NPs)

Als Kontrolle zu den nicht PEGylierten zoledronsäurehaltigen Nanopartikeln fungierten die Nanopartikel aus Phiole A, mit denen die Zellen inkubiert wurden.

4. Ergebnisse

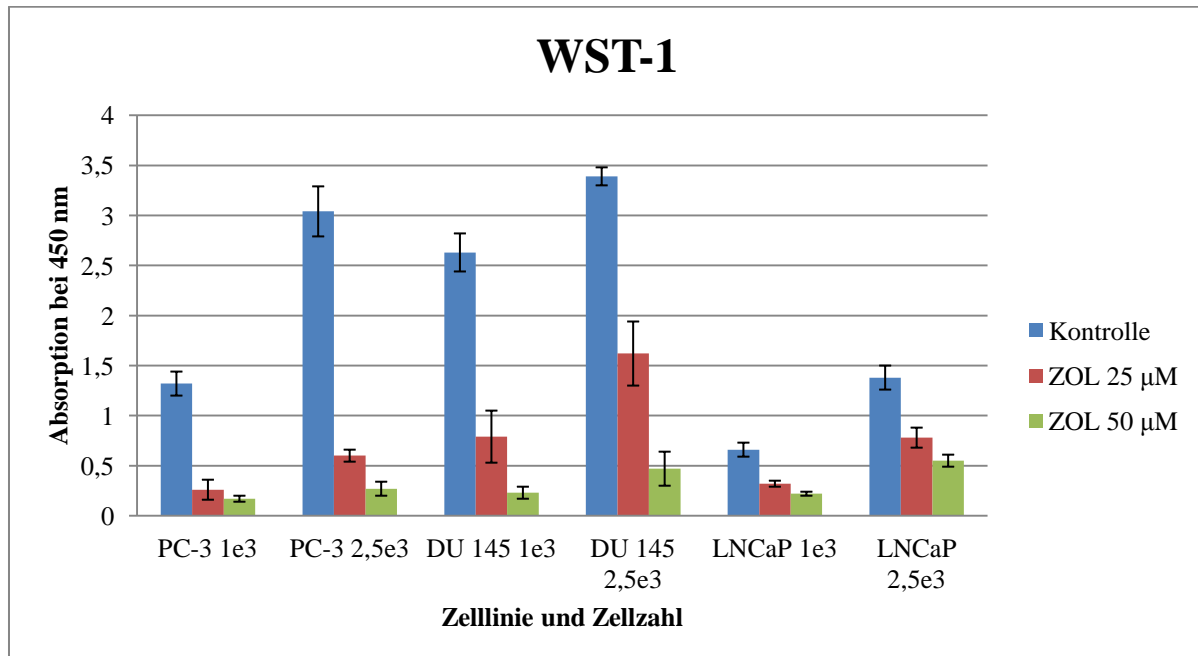
4.1 Ergebnisse 2D-Monolayer

4.1.1 Prostatakarzinomzellen

Cell Proliferation Reagent WST-1

Zunächst sollte der in der Literatur beschriebene zytotoxische Effekt der Zoledronsäure auf Prostatakarzinomzellen in vitro verifiziert und die für die Durchführung der folgenden Experimente geeigneten Zellzahlen und Zoledronsäurekonzentrationen bestimmt werden. Dazu wurden initial $1e^3$ bzw. $2,5e^3$ Zellen der Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP mit $25\mu\text{M}$ bzw. $50\mu\text{M}$ Zoledronsäure inkubiert. Fünf Tage nach Substanzzugabe wurde der WST-1-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse nach 60-minütiger Inkubation mit WST-1 Reaction mixture sind in Abbildung 4.1 und Tabelle 4.1 dargestellt.

Abb. 4.1 Nachweis des zytotoxischen Effektes $25\mu\text{M}$ bzw. $50\mu\text{M}$ Zoledronsäure auf die Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP mittels WST-1-Assay. Aussaat von initial $1e^3$ bzw. $2,5e^3$ Zellen, Substanzzugabe 24h nach Aussaat, WST-1-Assay 5 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.1 Absorptionswerte aus Abb. 4.1 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

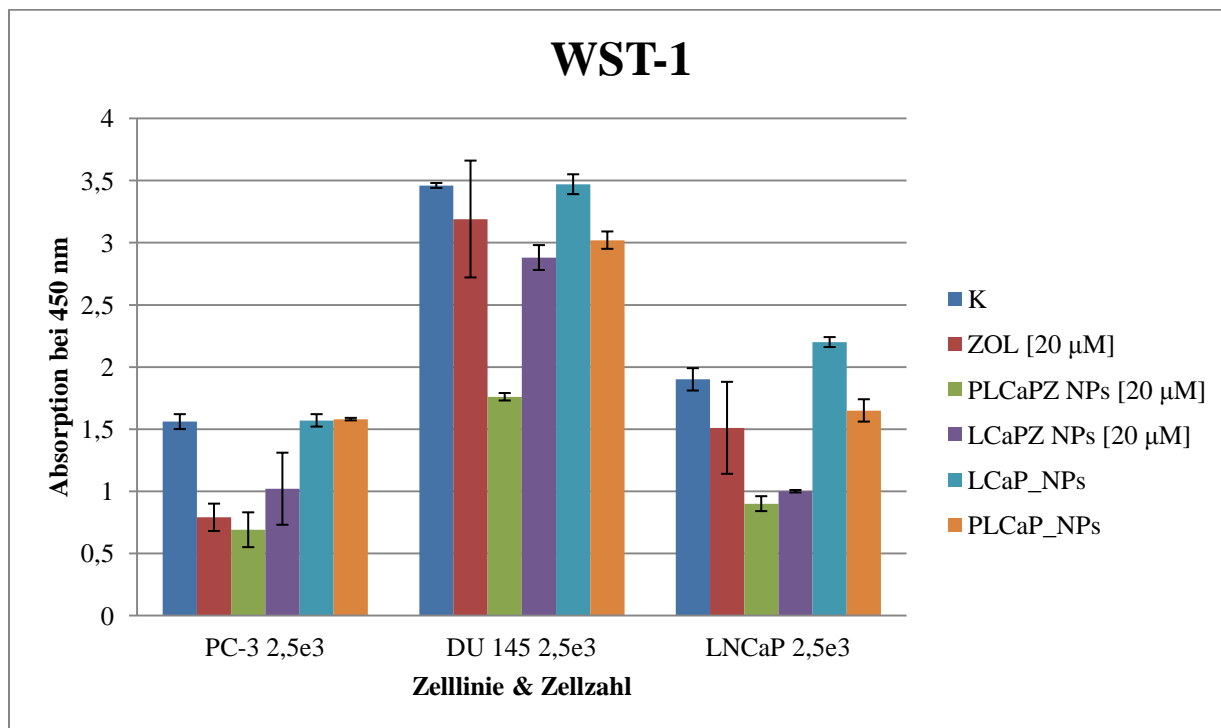
| Zelllinie und Zellzahl | PC-3 1e3 | PC-3 2,5e3 | DU 145 1e3 | DU 145 2,5e3 | LNCaP 1e3 | LNCaP 2,5e3 |
|-------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|
| Kontrolle [%] | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| ZOL 25 μ M [%] | 19,7 | 19,7 | 30 | 47,8 | 48,5 | 56,5 |
| ZOL 50 μ M [%] | 12,88 | 8,8 | 8,8 | 13,9 | 33,3 | 39,9 |

Unabhängig von der Zellzahl kann für die freie Zoledronsäure eine dosisabhängige Viabilitätsabnahme in den drei verwendeten Prostatakarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Im Vergleich zur biologischen Kontrolle wird bei Verwendung 25 μ M Zoledronsäure in PC-3 Zellen für beide Zellzahlen eine Abnahme der Absorptionswerte auf ca. 20% beobachtet. In DU 145 Zellen sinken die Absorptionswerte auf ca. 30% (1e³) bzw. 48% (2,5e³) der für die biologische Kontrolle gemessenen Werte. LNCaP-Zellen reagieren auf die Inkubation mit 25 μ M Zoledronsäure mit einer Abnahme der Absorptionswerte auf ca. 49% (1e³) bzw. 57% (2,5e³) im Vergleich zur Kontrolle. Bei Applikation von 50 μ M Zoledronsäure sinken in der Zelllinie PC-3 die prozentualen Absorptionswerte weiter auf ca. 13% (1e³) bzw. 9% (2,5e³). Für die Zelllinie DU 145 liegen die entsprechenden relativen Absorptionswerte bei ca 9% (1e³) und 14% (2,5e³). Unter den drei verschiedenen Zelllinien führt 50 μ M Zoledronsäure in LNCaP-Zellen zur geringsten Abnahme der Zellviabilität. Die gemessenen Absorptionswerte betragen im Vergleich zur biologischen Kontrolle 33% (1e³) bzw. 40% (2,5e³) (Tab. 4.1). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden für die Beantwortung von Fragestellungen im zweidimensionalen Zellkultursystem zu Beginn eines jeden Experimentes 2,5e³ Zellen ausplattiert, welche in der Regel mit den unterschiedlichen Substanzen in 20 μ M Konzentration inkubiert wurden.

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob das zytotoxische Potenzial der freien Zoledronsäure gegen Prostatakarzinomzelllinien durch deren Enkapsulierung in die zuvor beschriebenen Nanovektoren gesteigert werden kann. Zu diesem Zwecke wurden 2,5e³ Zellen der drei Prostatakarzinomzelllinien mit den entsprechenden Substanzen in 20 μ M Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurden PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel appliziert. Die Auswirkung der unterschiedlichen Substanzen auf die Prostatakarzinomzellen wurde vier Tage nach Substanzzugabe mittels WST-1-Assay bestimmt und mit der biologischen Kontrolle sowie der freien Zoledronsäure verglichen. Die Ergebnisse nach 90-minütiger Inkubation mit WST-1 Reaction mixture stellt Abbildung 4.2

graphisch dar. Die prozentualen Absorptionswerte der einzelnen Substanzen im Verhältnis zur jeweiligen biologischen Kontrolle zeigt Tabelle 4.2.

Abb. 4.2 Vergleich des zytotoxischen Potenzials der freien Zoledronsäure und PLCaPZ NPs bzw. LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration gegen Prostatakarzinomzellen der Linien PC-3, DU 145 und LNCaP mittels WST-1-Assay. Substanzzugabe 24h nach Aussaat, WST-1-Assay 4 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.2 Absorptionswerte aus Abb. 4.2 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Zelllinie & Zellzahl | K [%] | ZOL [20 µM] [%] | PLCaPZ NPs [20 µM] [%] | LCaPZ NPs [20 µM] [%] | PLCaP_NPs [%] | LCaP_NPs [%] |
|--------------------------|-------|-----------------|------------------------|-----------------------|---------------|--------------|
| PC-3 2,5e ³ | 100 | 50,64 | 44,23 | 65,38 | 100,64 | 101,28 |
| DU 145 2,5e ³ | 100 | 92,2 | 50,87 | 83,24 | 100,29 | 87,28 |
| LNCaP 2,5e ³ | 100 | 79,47 | 47,37 | 52,63 | 115,79 | 86,84 |

20µM freie Zoledronsäure führt in PC-3 Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität, sichtbar am Absinken des mittleren Absorptionswertes auf ca. 51% des für die biologische Kontrolle gemessenen. Die mit einem Abfall des mittleren Absorptionswertes auf 44% im Vergleich zur biologischen Kontrolle stärkste Abnahme der Zellviabilität wird in dieser Zelllinie nach Inkubation mit PLCaPZ NPs beobachtet. Dem gegenüber beträgt der relative Absorptionswert der PC-3-Zellen nach Applikation von LCaPZ NPs verglichen mit den unbehandelten Zellen der biologischen Kontrolle 65% und liegt somit höher als bei

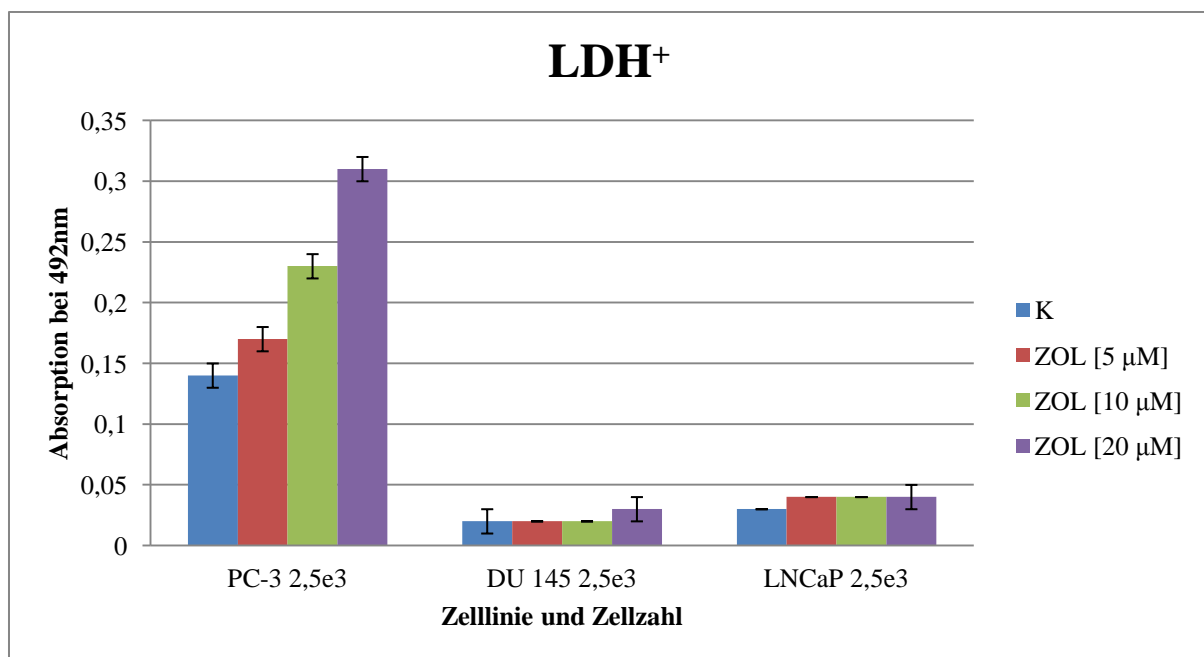
Verwendung freier Zoledronsäure bzw. PLCaPZ NPs. Die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel beeinflussen die Zellviabilität dieser Zelllinie nicht, die gemessenen Absorptionswerte der PC-3-Zellen entsprechen jeweils ca. 101% des für die biologische Kontrolle ermittelten Wertes. In der Zelllinie DU 145 kann für die freie Zoledronsäure in 20µM Konzentration nur eine marginale Abnahme der Zellviabilität nachgewiesen werden. Der relative Absorptionswert im Vergleich zur biologischen Kontrolle liegt bei 92%. Nach Applikation von LCaPZ NPs wird eine geringfügig stärkere Reduktion der Zellviabilität von DU 145-Zellen auf 83% verglichen mit der biologischen Kontrolle detektiert. Die mit einem Abfall des relativen Absorptionswertes auf 51% im Vergleich zur biologischen Kontrolle stärkste Abnahme der Zellviabilität wird bei Inkubation mit PLCaPZ NPs beobachtet. Unter den Zoledronsäure-freien Kontrollpartikeln führen LCaP_NPs zu einem Absinken des relativen Absorptionswertes der DU 145-Zellen auf 87% im Verhältnis zu den Kontrollzellen, PLCaP_NPs bewirken mit einem relativen Absorptionswert von ca. 100% in direktem Vergleich mit den unbehandelten Zellen der biologischen Kontrolle keine Veränderung der Zellviabilität. Nach Inkubation von LNCaP-Zellen mit freier 20µM Zoledronsäure wird ein Abfall des mittleren Absorptionswertes auf ca. 79% im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen der biologischen Kontrolle beobachtet. LCaPZ NPs bewirken eine stärkere Abnahme der Zellviabilität von LNCaP-Zellen auf ca. 53% verglichen mit der biologischen Kontrolle. Die stärkste Viabilitätsabnahme mit Reduktion des mittleren Absorptionswertes auf ca. 47% im Verhältnis zu unbehandelten LNCaP-Zellen wird durch PLCaPZ NPs erreicht. Während nach Inkubation der LNCaP-Zellen mit PLCaP_NPs im Vergleich zur biologischen Kontrolle höhere Absorptionswerte (116%) gemessen werden, betragen diese nach Applikation von LCaP_NPs 87% des für die biologische Kontrolle gemessenen Wertes. In allen drei Zelllinien wird somit die stärkste Abnahme der Zellviabilität nach Applikation von PLCaPZ NPs beobachtet. Nur in DU 145- und LNCaP-Zellen führen LCaPZ NPs im Vergleich zur freien Zoledronsäure zu einer verstärkten Abnahme der Zellviabilität (83% vs. 92% bei DU 145-Zellen bzw. 53% vs. 79% in LNCaP-Zellen). In PC-3-Zellen werden hingegen für die freie Zoledronsäure niedrigere Absorptionswerte gemessen als für LCaPZ NPs (51% vs. 65%).

Der WST-1-Assay ermöglicht Rückschlüsse auf die Vitalität der untersuchten Zellen. Er ist jedoch nicht in der Lage, die den beobachteten Veränderungen zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen zu klären. Um nähere Erkenntnisse über das Wirkprinzip der einzelnen Substanzen zu gewinnen, wurden - zunächst nur unter Verwendung freier Zoledronsäure - weitere Zellkulturassays durchgeführt.

Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}

Zum Nachweis einer etwaigen Induktion von Nekrose als potenzieller Wirkmechanismus der Zoledronsäure gegen Prostatakarzinomzellen wurde der Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} angewendet. $2,5 \times 10^3$ Zellen der drei Tumorzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP wurden mit steigenden Konzentrationen freier Zoledronsäure zwischen $5 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ inkubiert, bevor am vierten Tag nach Substanzzugabe der LDH⁺-Assay durchgeführt wurde, dessen Substratreaktion nach 7 Minuten gestoppt wurde. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 4.3 dargestellt, Tabelle 4.3 gibt die prozentualen Absorptionswerte in Bezug auf die jeweilige biologische Kontrolle wieder.

Abb. 4.3 Ergebnisse des Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}-Assays an Prostatakarzinomzellen der Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP zum Nachweis von Nekrose nach Inkubation mit 5, 10 und $20 \mu\text{M}$ Zoledronsäure. Substanzzugabe 24h nach Aussaat, Auswertung 4Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.3 Absorptionswerte aus Abb. 4.3 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Zelllinie & Zellzahl | K [%] | ZOL [5 μM] [%] | ZOL [10 μM] [%] | ZOL [20 μM] [%] |
|--------------------------|-------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| PC-3 2,5e ³ | 100 | 121,43 | 164,29 | 221,43 |
| DU 145 2,5e ³ | 100 | 100 | 100 | 150 |
| LNCaP 2,5e ³ | 100 | 133,33 | 133,33 | 133,33 |

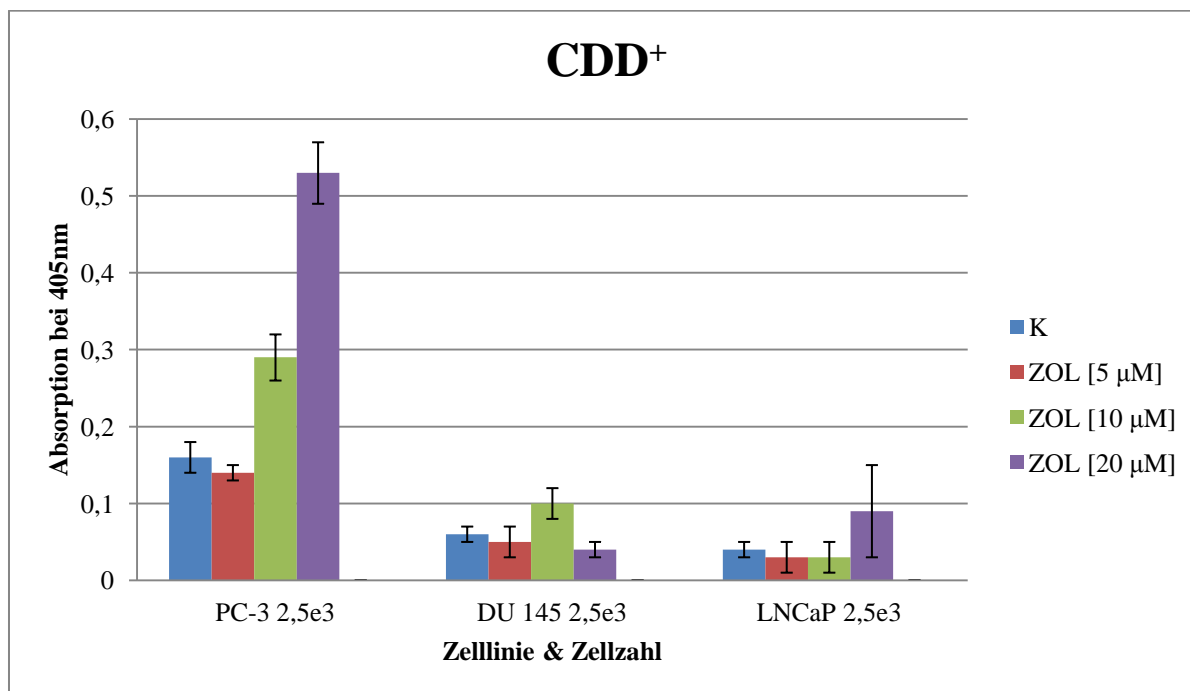
Im Vergleich zu den nicht dargestellten Absorptionswerten der Lysekontrollen, welche sich zwischen 1,5 und 1,8 bewegen, werden für sämtliche Zelllinien nur sehr niedrige absolute

Absorptionswerte gemessen. Für DU 145-Zellen liegen diese zwischen 0,02 und 0,03. (Abb. 4.3) In dieser Zelllinie kann erst bei Inkubation mit 20µM Zoledronsäure eine Induktion von Nekrose, sichtbar an einer erhöhten Konzentration von LDH im Zellkulturüberstand im Vergleich zur biologischen Kontrolle, nachgewiesen werden (150 vs. 100%). Die absoluten Absorptionswerte von LNCaP-Zellen betragen zwischen 0,03 und 0,04 (Abb. 4.3). Im Zellkulturüberstand von LNCaP-Zellen wird bereits ab einer Zoledronsäurekonzentration von 5µM ein dosisunabhängiger, konstanter Konzentrationsanstieg der LDH auf 133% verglichen mit unbehandelten LNCaP-Zellen gemessen. (Tab. 4.3) Bei der Zelllinie PC-3 kommt es hingegen zu einem dosisabhängigen, stufenweisen Anstieg der LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand. Für 20µM Zoledronsäure beträgt der mittlere Absorptionswert ca. 220% der biologischen Kontrolle (Tab. 4.3). Dabei werden absolut im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien wesentlich höhere Absorptionswerte zwischen 0,14 und 0,31 gemessen (Abb. 4.3).

Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Desweiteren galt es, eine Induktion von Apoptose in Prostatakarzinomzellen durch Inkubation mit Zoledronsäure als etwaigen Wirkmechanismus abzuklären. Hierzu wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen der drei Prostatakarzinomzelllinien mit 5µM, 10µM und 20µM freier Zoledronsäure inkubiert. Vier Tage nach Substanzzugabe wurde der CDD⁺-Assay durchgeführt, dessen Farbreaktion 7 Minuten nach Substanzzugabe gestoppt wurde. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 4.4, in Tabelle 4.4 werden die absoluten Absorptionswerte in Prozent im Vergleich zur jeweiligen biologischen Kontrolle angegeben.

Abb. 4.4 Ergebnisse des CDD⁺-Assays an Prostatakarzinomzellen der Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP zum Nachweis von Apoptose nach Inkubation mit 5, 10 und 20µM Zoledronsäure. Substanzzugabe 24h nach Aussaat, Auswertung 4Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.4 Absorptionswerte aus Abb. 4.4 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

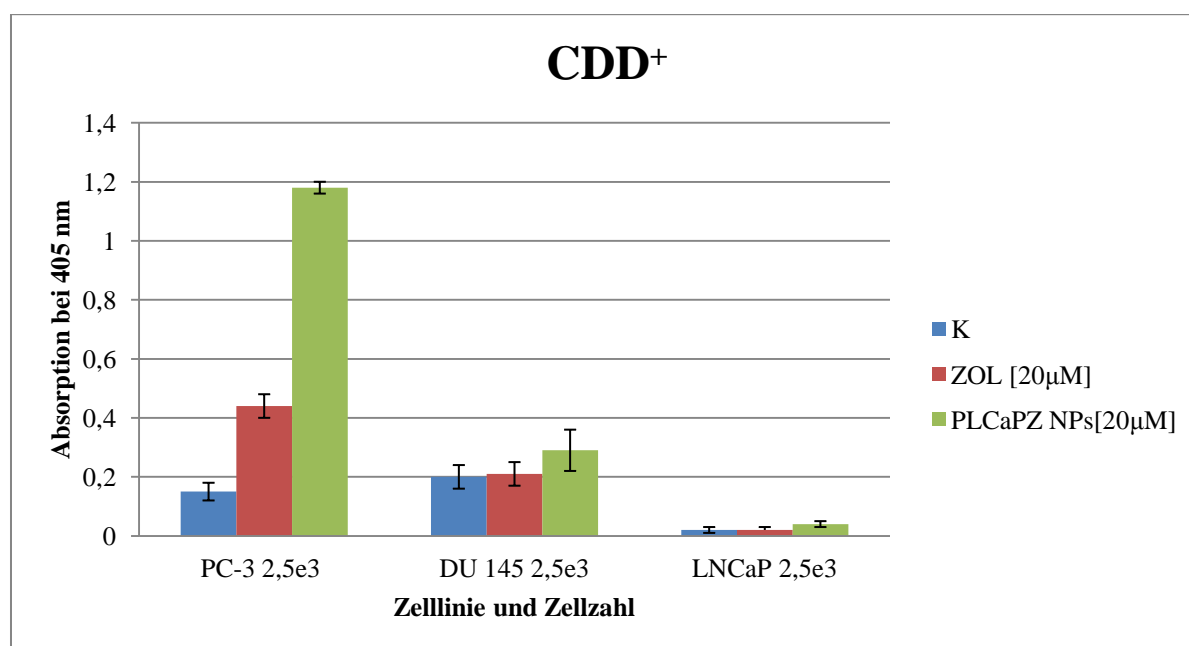
| Zelllinie & Zellzahl | K [%] | ZOL [5 µM] [%] | ZOL [10 µM] [%] | ZOL [20 µM] [%] |
|--------------------------|-------|----------------|-----------------|-----------------|
| PC-3 2,5e ³ | 100 | 87,5 | 181,25 | 331,25 |
| DU 145 2,5e ³ | 100 | 83,33 | 166,67 | 66,67 |
| LNCaP 2,5e ³ | 100 | 75 | 75 | 225 |

Verglichen mit dem absoluten Absorptionswert von 1,94 der nicht dargestellten Positivkontrolle werden bei allen drei Zelllinien nur sehr niedrige absolute Absorptionswerte gemessen. Diese liegen für DU 145- und LNCaP-Zellen zwischen 0,03 und 0,1 bzw. zwischen 0,14 und 0,53 für PC-3-Zellen (Abb. 4.4). Im Falle der Zelllinie DU 145 wird der im Vergleich zur biologischen Kontrolle mit 167% höchste relative Absorptionswert bei Inkubation mit 10µM Zoledronsäure nachgewiesen. Für 5µM bzw. 20µM Zoledronsäure liegen die prozentualen Absorptionswerte mit 83% bzw. 67% unterhalb der mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle. In LNCaP-Zellen wird erst nach Applikation von 20µM freier Zoledronsäure eine Induktion von Apoptose nachgewiesen, sichtbar an einem Anstieg der Absorption auf 225% im Vergleich zur Kontrolle. Für 5µM und 10µM Zoledronsäure liegen die Absorptionswerte mit 75% unter dem der biologischen Kontrolle. In

der Zelllinie PC-3 kann ab einer Zoledronsäurekonzentration von 10µM eine dosisabhängige Induktion von Apoptose nachgewiesen werden, mit einer Zunahme der Absorptionswerte auf über das Dreifache (331%) im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei Inkubation mit 20µM Zoledronsäure (Tab. 4.4).

Auch das Potenzial von PLCaPZ NPs zur Induktion von Apoptose in den drei verwendeten Prostatakarzinomzelllinien sollte untersucht und mit dem der freien Zoledronsäure verglichen werden. Beide Substanzen wurden in 20µM Konzentration appliziert, der CDD⁺-Assay wurde vier Tage nach Substanzzugabe ausgewertet. Die Ergebnisse nach 4,5-minütiger Substratreaktion sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Die korrespondierenden relativen Absorptionswerte im Vergleich zur biologischen Kontrolle zeigt Tabelle 4.5.

Abb. 4.5 Ergebnisse des CDD⁺-Assays an Prostatakarzinomzellen der Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP zum Nachweis von Apoptose nach Inkubation mit 20µM freier Zoledronsäure und 20µM PLCaPZ NPs. Substanzzugabe 24h nach Aussaat, Auswertung 4Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.5 Absorptionswerte aus Abb. 4.5 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

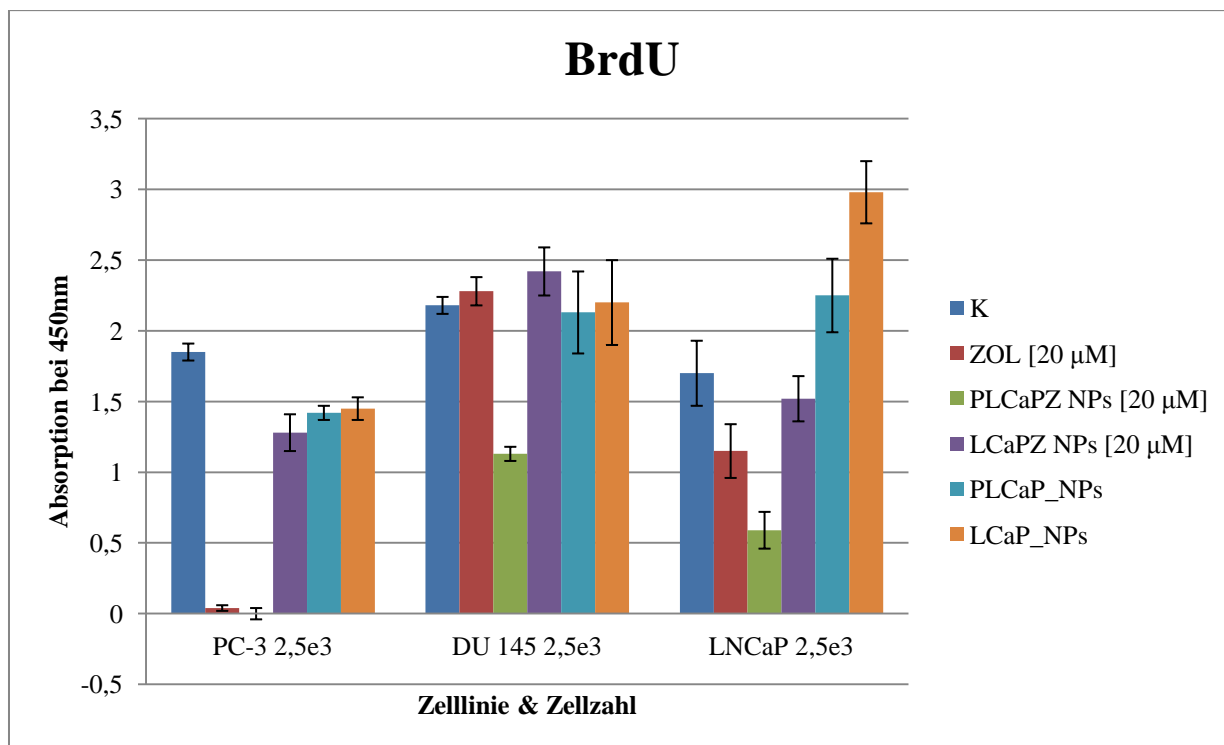
| Zelllinie & Zellzahl | K [%] | ZOL [20µM] [%] | PLCaPZ NPs[20µM] [%] |
|----------------------|-------|----------------|----------------------|
| PC-3 2,5e3 | 100 | 293 | 786,7 |
| DU 145 2,5e3 | 100 | 105 | 145 |
| LNCaP 2,5e3 | 100 | 100 | 200 |

Für LNCaP Zellen werden nur auffallend niedrige Absorptionswerte zwischen 0,02 und 0,04 gemessen (Abb. 4.5). 20µM freie Zoledronsäure induziert lediglich in PC-3-Zellen Apoptose mit einer annähernden Verdreifachung der Absorptionswerte auf ca. 293% im Vergleich zur biologischen Kontrolle. Für DU 145- und LNCaP-Zellen unterscheiden sich die relativen Absorptionswerte nach Inkubation mit 20µM freier Zoledronsäure mit 105% bzw. 100% nicht von denen ihrer biologischen Kontrollen. In diesen beiden Zelllinien wird erst nach Applikation von 20µM PLCaPZ NPs Apoptose geringen Ausmaßes induziert. Im Vergleich zur biologischen Kontrolle steigen die prozentualen Absorptionswerte auf 145% (DU 145) bzw. 200% (LNCaP). Vor allem in PC-3-Zellen wird nach Applikation von PLCaPZ NPs eine verstärkte Induktion von Apoptose nachgewiesen. Der relative Absorptionswert für PC-3-Zellen nach Inkubation mit PLCaPZ NPs beträgt mit 787% annähernd das Achtfache des der biologischen Kontrolle bzw. mehr als das Zweieinhalbfache des der freien Zoledronsäure (Tab.4.5).

BrdU

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch die Behandlung mit den unterschiedlichen Testsubstanzen die Proliferation der untersuchten Prostatakarzinomzellen gehemmt werden kann. Zur Quantifizierung der Proliferationshemmung wurde der BrdU-Assay verwendet. 2,5e³ Zellen der drei Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP wurden mit sämtlichen Varianten der Zoledronsäure in 20µM Konzentration sowie mit Zoledronsäure-freien Nanovektoren als Kontrollpartikel inkubiert. Vier Tage nach Substanzzugabe wurde der BrdU-Assay durchgeführt, dessen Ergebnisse nach 8-minütiger Farbreaktion Abbildung 4.6 zeigt. Die entsprechenden absoluten Absorptionswerte werden in Tabelle 4.6 prozentual im Vergleich zur jeweiligen biologischen Kontrolle angegeben.

Abb. 4.6 BrdU-Assay zur Quantifizierung der Proliferationshemmung der Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP durch Inkubation mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Substanzzugabe 24h nach Aussaat der Zellen, Auswertung des BrdU-Assays 4 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.6 Absorptionswerte aus Abb. 4.6 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Zelllinie & Zellzahl | K [%] | ZOL [20 µM] [%] | PLCaPZ NPs [20 µM] [%] | LCaPZ NPs [20 µM] [%] | PLCaP_NPs [%] | LCaP_NPs [%] |
|--------------------------|-------|-----------------|------------------------|-----------------------|---------------|--------------|
| PC-3 2,5e ³ | 100 | 2,2 | 0 | 69,2 | 76,8 | 78,4 |
| DU 145 2,5e ³ | 100 | 104,6 | 51,8 | 111 | 97,7 | 100,9 |
| LNCaP 2,5e ³ | 100 | 67,6 | 34,7 | 89,4 | 132,4 | 175,3 |

Die stärkste antiproliferative Wirkung der einzelnen Testsubstanzen kann in der Zelllinie PC-3 nachgewiesen werden. Hier bewirkt bereits die freie Zoledronsäure eine Abnahme der Zellproliferation auf 2% im Vergleich zur Kontrolle. Bei Applikation von PLCaPZ NPs kommt es in PC-3-Zellen zum vollständigen Sistieren der Zellproliferation. Demgegenüber hemmen LCaPZ NPs die Proliferation von PC-3-Zellen weniger effizient als die freie Zoledronsäure (69 vs. 2%). Auch die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel führen in dieser Zelllinie zu einer leichten Inhibition der Zellproliferation mit einer Abnahme der

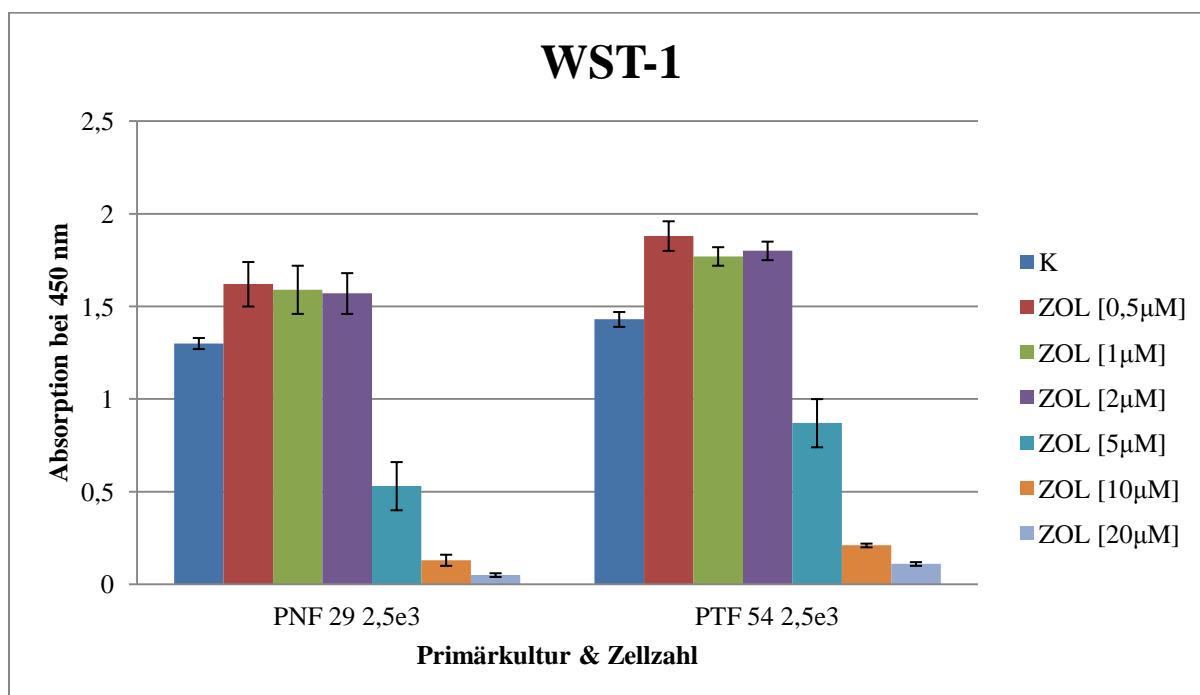
Absorptionswerte auf knapp 80% der für die biologische Kontrolle gemessenen Werte. Die Proliferation von DU 145-Zellen kann nur durch PLCaPZ NPs gehemmt werden. Bei Inkubation mit dieser Nanomodifikation der freien Zoledronsäure nimmt die Proliferationsrate um fast 50% auf ca. 52% im Vergleich zur Kontrolle ab. Weder für die freie Zoledronsäure noch für LCaPZ NPs kann in dieser Zelllinie eine Inhibition der Zellproliferation nachgewiesen werden. Die Absorptionswerte liegen mit 105% bzw. 111% oberhalb des Wertes der biologischen Kontrolle. Für die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel werden Absorptionswerte zwischen 98% (PLCaP_NPs) und 101% (LCaP_NPs) gemessen, die somit in der Größenordnung der biologischen Kontrolle liegen. In der Zelllinie LNCaP üben alle drei Zoledronsäureformen eine antiproliferative Wirkung aus. Während die freie Zoledronsäure zu einer Reduktion der Proliferationsrate auf 68% im Vergleich zur Kontrolle führt, wird durch deren Verpackung in pegylierte Nanopartikel eine Steigerung ihrer antiproliferativen Wirkstärke beobachtet, was in einer Abnahme des mittleren Absorptionswertes auf 35% deutlich wird. Für die nicht pegylierten Nanopartikel der LCaPZ NPs wird in dieser Zelllinie ein Absorptionswert gemessen, der 78% der biologischen Kontrolle entspricht und somit eine geringere Abnahme der Zellproliferation als bei Verwendung freier Zoledronsäure bzw. PLCaPZ NPs anzeigt. Die Absorptionswerte der Kontrollpartikel übersteigen mit 130% (PLCaP_NPs) bzw. 175% (LCaP_NPs) den der biologischen Kontrolle (Tab. 4.6).

4.1.2 Tumorassoziierte Fibroblasten

Cell Proliferation Reagent WST-1

Neben der direkten Wirkung der Zoledronsäure und ihrer Nanomodifikationen auf Prostatakarzinomzellen sollte auch die Bedeutung von Wechselwirkungen zwischen Tumorepithelzellen und CAFs für die antitumorale Effizienz der einzelnen Substanzen untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurden außer den drei Prostatakarzinomzelllinien auch tumorassoziierte Fibroblasten mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. $2,5 \times 10^3$ Zellen der aus Primärkulturen stammenden tumorassoziierten Fibroblasten wurden hierbei zunächst mit steigenden Konzentrationen freier Zoledronsäure zwischen $0,5 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ versetzt, um die mittlere inhibitorische Konzentration dieser Substanz bei den verwendeten Fibroblasten zu bestimmen. 4 Tage nach Substanzzugabe wurde der WST-1-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Experimentes nach 60-minütiger Inkubation mit WST-1 Reaction mixture zeigen Abbildung 4.7 und Tabelle 4.7.

Abb. 4.7 Nachweis des zytotoxischen Effektes unterschiedlicher Konzentrationen freier Zoledronsäure gegen Primärkulturen der tumorassoziierten Fibroblasten PNF 29 und PTF 54 mittels WST-1-Assay. Substanzzugabe 24 h nach Aussaat der Zellen, Auswertung des WST-1-Assays 4 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.7 Absorptionswerte aus Abb. 4.7 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

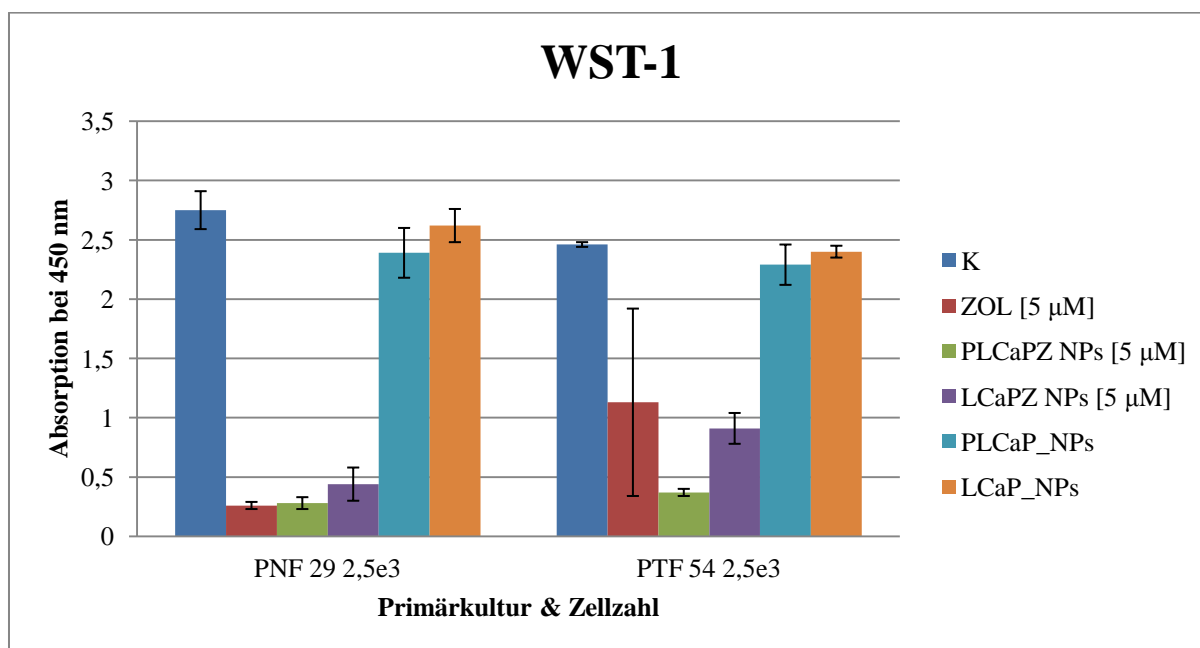
| Primärkultur & Zellzahl | K [%] | ZOL [0,5µM] [%] | ZOL [1µM] [%] | ZOL [2µM] [%] | ZOL [5µM] [%] | ZOL [10µM] [%] | ZOL [20µM] [%] |
|--------------------------|-------|-----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| PNF 29 2,5e ³ | 100 | 124,62 | 122,31 | 120,77 | 40,77 | 10 | 3,85 |
| PTF 54 2,5e ³ | 100 | 131,47 | 123,78 | 125,87 | 60,84 | 14,69 | 7,69 |

Für Konzentrationen zwischen 0,5µM und 2µM kommt es weder in PNF 29- noch PTF 54-Zellen zu einer Abnahme der Zellviabilität. Die Absorptionswerte schwanken für beide Zelllinien in einer Größenordnung zwischen 121% bis 131% im Vergleich zu den biologischen Kontrollen. Erst nach Inkubation mit 5µM Zoledronsäure kommt es zu einem Absinken der Absorptionswerte auf 40% der für die biologische Kontrolle gemessenen Werte im Falle von PNF 29-Zellen bzw. 60% bei PTF 54-Zellen. Bei Verwendung noch höherer Konzentrationen freier Zoledronsäure kommt es im Sinne einer dosisabhängigen Wirkungsweise zu einem weiteren Absinken der Absorptionswerte auf letztlich ca. 4% (PNF 29) bzw. 8% (PTF 54) im Vergleich zur biologischen Kontrolle bei Verwendung von 20µM Zoledronsäure (Tab. 4.7). Angesichts dieser Ergebnisse siedelten wir den IC50-Wert der

freien Zoledronsäure für die verwendeten Fibroblasten bei 5µM an. Für die weiteren Experimente mit Fibroblasten im zweidimensionalen Zellkultursystem wurden die freie Zoledronsäure bzw. ihre entsprechenden Nanomodifikationen in einer Konzentration von 5µM verwendet.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob durch die Einkapsulierung der freien Zoledronsäure in die beiden unterschiedlichen Nanovektoren ihre Wirksamkeit gegen tumorassoziierte Fibroblasten modifiziert wird. Dazu wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen der Primärkulturen PNF 29 und PTF 54 mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 5µM Konzentration sowie den Kontrollpartikeln PLCaP_NPs und LCaP_NPs inkubiert. Der WST-1-Assay wurde vier Tage nach Substanzzugabe durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Assays nach 90-minütiger Inkubation mit WST-1 Reaction mixture veranschaulichen Grafik 4.8 und Tabelle 4.8.

Abb. 4.8 Vergleich des zytotoxischen Potenzials der freien Zoledronsäure und PLCaPZ NPs bzw. LCaPZ NPs in jeweils 5µM Konzentration gegen Prostatakarzinom-assoziierte Fibroblasten der Linien PNF 29 und PTF 54 mittels WST-1-Assay. Substanzzugabe 24h nach Aussaat, WST-1-Assay 4 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.8 Absorptionswerte aus Abb. 4.8 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

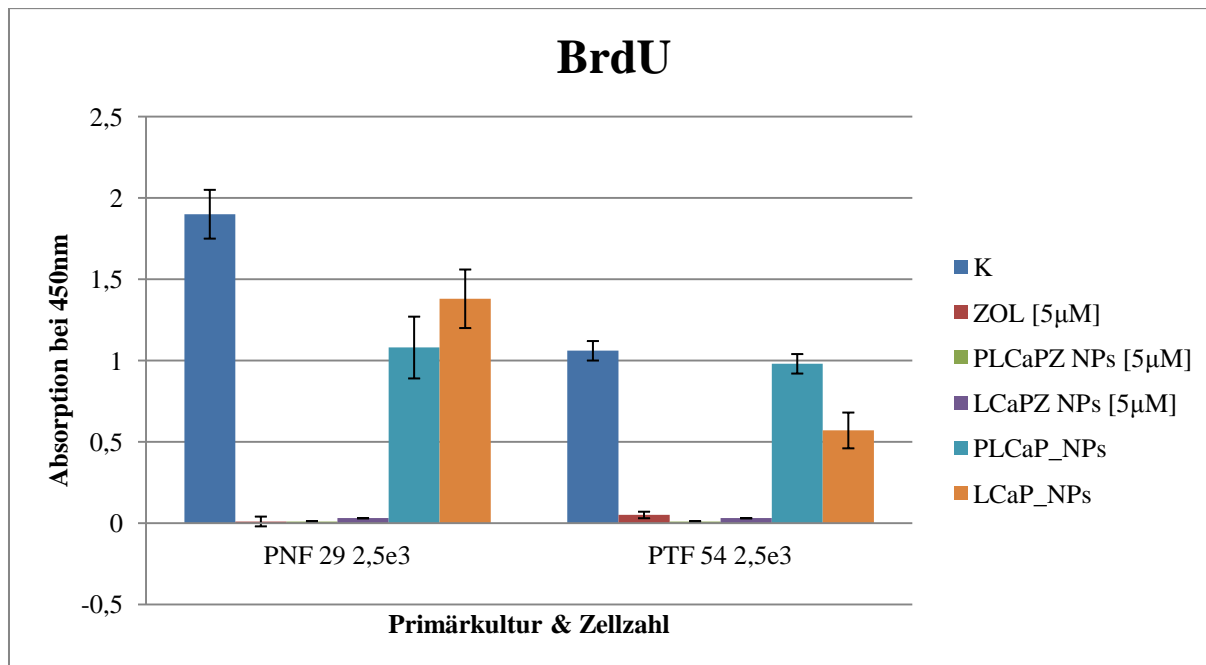
| Primärkultur & Zellzahl | K [%] | ZOL [5 µM] [%] | PLCaPZ NPs [5 µM] [%] | LCaPZ NPs [5 µM] [%] | PLCaP_NPs [%] | LCaP_NPs [%] |
|-------------------------|-------|----------------|-----------------------|----------------------|---------------|--------------|
| PNF 29 2,5e3 | 100 | 9,45 | 10,18 | 16 | 86,91 | 95,27 |
| PTF 54 2,5e3 | 100 | 45,93 | 15,04 | 36,99 | 93,09 | 97,56 |

In PNF 29-Zellen kommt es durch eine Inkubation mit freier Zoledronsäure zur stärksten Abnahme der Zellviabilität. Im Vergleich zur biologischen Kontrolle liegen die Absorptionswerte bei ca. 9%. Nahezu identische Absorptionswerte werden für PLCaPZ NPs gemessen. Die Applikation von LCaPZ NPs führt zu einer etwas geringeren Reduktion der Zellviabilität auf 16%. Für die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel werden Absorptionswerte gemessen, die etwa 87% (PLCaP_NPs) bzw. 95% (LCaP_NPs) des Wertes der biologischen Kontrolle entsprechen. In PTF 54-Zellen ist die Wirkung der verwendeten Substanzen im Vergleich zu den PNF 29-Zellen insgesamt schwächer ausgeprägt. Die stärkste Viabilitätsreduktion der Zellen kann bei Inkubation mit PLCaPZ NPs verzeichnet werden, mit einem Absinken der Absorptionswerte auf ca. 15% im Verhältnis zur biologischen Kontrolle. Für die freie Zoledronsäure liegen die entsprechenden Absorptionswerte bei knapp 46%. Durch das Verpacken der freien Zoledronsäure in pegylierte Nanopartikel wird somit eine Steigerung ihrer zytotoxischen Wirkung gegen PTF 54-Zellen beobachtet. Die für LCaPZ NPs gemessenen Absorptionswerte liegen mit ca. 36% der für die biologische Kontrolle nachgewiesenen Werte geringfügig tiefer als bei Verwendung freier Zoledronsäure. Die Kontrollpartikel zeigen keinen wesentlichen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, sichtbar an den zur biologischen Kontrolle annähernd gleichen Absorptionswerten von 93% (PLCaP_NPs) und 98% (LCaP_NPs) (Tab. 4.8).

BrdU

Nachdem für die Testsubstanzen auch in tumorassoziierten Fibroblasten eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte, sollte der diesem Effekt zu Grunde liegende Mechanismus geklärt werden. Als grundlegendes Wirkprinzip wurde aufgrund der Vorergebnisse eine Hemmung der Zellproliferation angenommen, weswegen der BrdU-Assay durchgeführt wurde, dessen Ergebnisse in Abbildung 4.9 und Tabelle 4.9 veranschaulicht werden. Der Assay wurde vier Tage nach Substanzzugabe durchgeführt, die Substratreaktion wurde nach 20 Minuten gestoppt.

Abb. 4.9 Ergebnisse des BrdU-Assays zur Quantifizierung der Proliferationshemmung tumorassoziierter Fibroblasten der Linien PNF 29 und PTF 54 durch Inkubation mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 5µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Substanzzugabe 24h nach Aussaat der Zellen, Auswertung des BrdU-Assays 4 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.9 Absorptionswerte aus Abb. 4.9 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Primärkultur & Zellzahl | K [%] | ZOL [5µM] [%] | PLCaPZ NPs [5µM] [%] | LCaPZ NPs [5µM] [%] | PLCaP_NPs [%] | LCaP_NPs [%] |
|--------------------------|-------|---------------|----------------------|---------------------|---------------|--------------|
| PNF 29 2,5e ³ | 100 | 0,53 | 0,53 | 1,58 | 56,84 | 72,63 |
| PTF 54 2,5e ³ | 100 | 4,72 | 0,94 | 2,83 | 92,45 | 53,77 |

Durch alle Formen der Zoledronsäure kommt es zu einem fast vollständigen Sistieren der Zellproliferation mit einer Abnahme der Absorptionswerte auf unter 5% im Vergleich zur biologischen Kontrolle. Während PNF 29-Zellen keinen Unterschied zwischen freier Zoledronsäure und PLCaPZ NPs zeigen und die Absorptionswerte für beide Substanzen im Vergleich zur biologischen Kontrolle weniger als 1% betragen, weisen letztere in PTF 54-Zellen im Vergleich zu LCaPZ NPs und freier Zoledronsäure eine geringfügig potentere antiproliferative Wirkung auf. PLCaPZ NPs senken den Absorptionswert in PTF 54-Zellen auf unter 1%, freie Zoledronsäure und LCaPZ NPs auf knapp 5% bzw. 3%. Für die Kontrollpartikel lässt sich für beide Fibroblastentypen eine Abnahme der Absorptionswerte

und somit der Proliferationsrate im Vergleich zur biologischen Kontrolle beobachten. Die Absorptionswerte betragen im Falle von PNF 29-Zellen 57% für PLCaP_ NPs bzw. 73% für LCaP_ NPs. In PTF 54-Zellen kommt es zu einer Reduktion der Absorptionswerte auf 92% für PLCaP_ NPs bzw. 54% für LCaP_ NPs (Abb. 4.9).

4.2 Ergebnisse Sphäroide

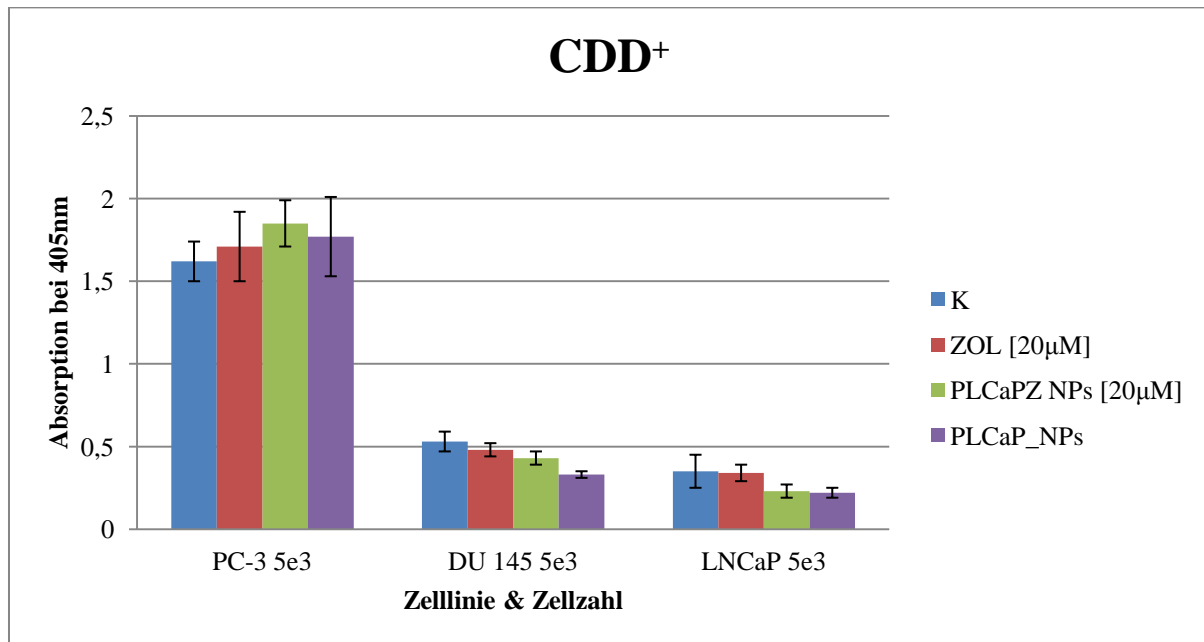
4.2.1 Homosphäroide

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede bezüglich des Wirkprinzipes der verwendeten Substanzen in Abhängigkeit vom Zellkultursystem gibt, wurden Zellkulturassays zum Nachweis von Nekrose und Apoptose auch an Sphäroiden durchgeführt.

Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Zum Nachweis einer Induktion von Apoptose in Sphäroiden durch Inkubation mit der freien Zoledronsäure bzw. ihrer Nanomodifikation PLCaPZ NPs wurde mangels Alternativen der an sich für die zweidimensionale Zellkultur entwickelte CDD⁺-Assay in modifizierter Form verwendet. Die drei verwendeten Prostatakarzinomzelllinien wurden als Sphäroide kultiviert und drei Tage nach Aussaat der Zellen den beiden Formen der Zoledronsäure in 20µM Konzentration ausgesetzt, bevor vier Tage nach Substanzzugabe der CDD⁺-Assay durchgeführt wurde. Abbildung 4.10 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse nach 4,5-minütiger Substratreaktion. In Tabelle 4.10 sind die entsprechenden absoluten Absorptionswerte in Prozent im Vergleich zur jeweiligen biologischen Kontrolle dargestellt.

Abb. 4.10 CDD⁺-Assay an Sphäroid-Kulturen der Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP zum Nachweis einer Induktion von Apoptose durch Behandlung mit freier Zoledronsäure bzw. PLCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. PLCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Substanzzugabe 72h nach Aussaat der Zellen, CDD⁺-Assay 4 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.10 Absorptionswerte aus Abb. 4.10 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Zelllinie & Zellzahl | K [%] | ZOL [20µM] [%] | PLCaPZ NPs [20µM] [%] | PLCaP_NPs [%] |
|------------------------|-------|----------------|-----------------------|---------------|
| PC-3 5e ³ | 100 | 105,6 | 114,2 | 109,3 |
| DU 145 5e ³ | 100 | 90,6 | 81,1 | 62,3 |
| LNCaP 5e ³ | 100 | 97,1 | 65,7 | 62,9 |

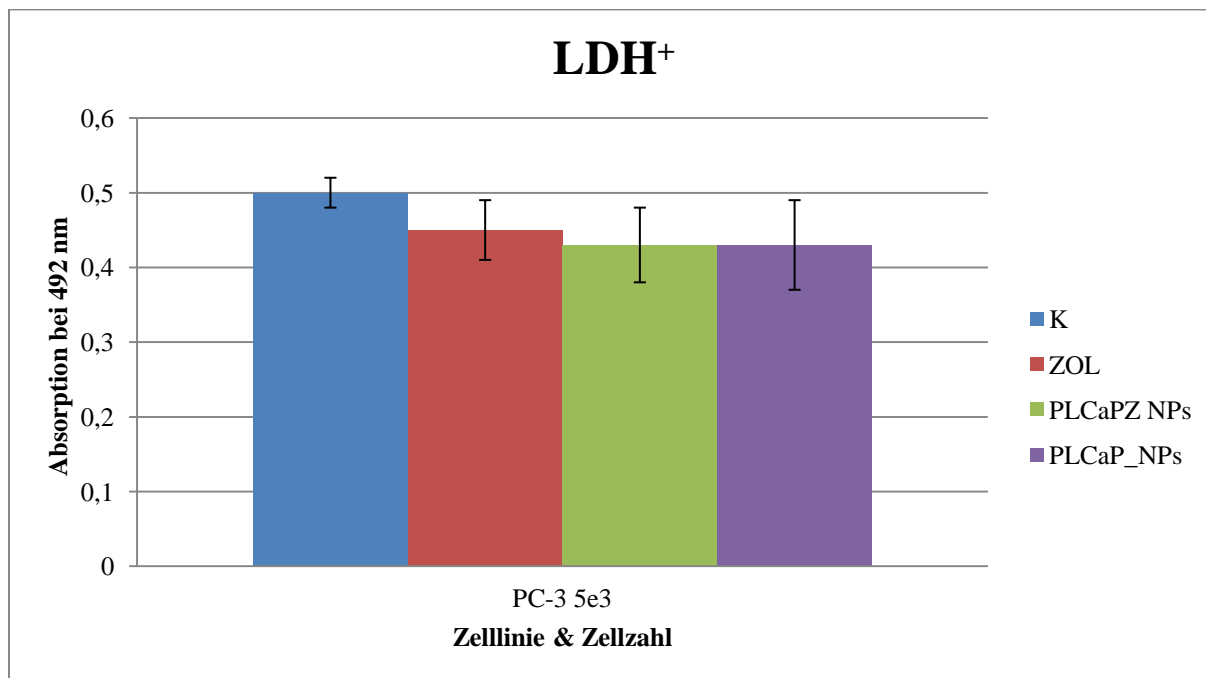
Besonders für die Zelllinie PC-3 fallen im Vergleich zur nicht abgebildeten Positivkontrolle (1,51) hohe Absorptionswerte bereits für die biologische Kontrolle (1,62) auf (Abb. 4.10). In dieser Zelllinie wird durch Inkubation mit freier Zoledronsäure nur in sehr geringem Ausmaß Apoptose induziert, sichtbar an dem mit 106% im Vergleich zur biologischen Kontrolle marginal erhöhten Absorptionswert. Die mit 114% des für die biologische Kontrolle gemessenen Absorptionswertes stärkste Induktion von Apoptose wird für die in die pegylierten Nanopartikel verpackte Zoledronsäure beobachtet. Auch die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel führen in PC-3-Zellen zu einem dezenten Anstieg des Absorptionswertes auf 109% im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 4.10). Bei den anderen Zelllinien werden nicht nur insgesamt deutlich niedrigere Absorptionswerte gemessen, sondern es kann auch keinerlei Induktion von Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 4.10). Tatsächlich liegen die für die

einzelnen Substanzen gemessenen Absorptionswerte unter denen der zugehörigen biologischen Kontrolle und bewegen sich im Vergleich zu dieser in einer Größenordnung zwischen 62% und 97% (Tab. 4.10).

Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}

Auch in der Sphäroidkultur sollte untersucht werden, ob es durch eine Behandlung mit freier Zoledronsäure bzw. PLCaPZ NPs zu einer verstärkten Induktion von Nekrose in Prostatakarzinomzellen kommt. In Analogie zum zweidimensionalen Zellkultursystem wurde hierfür der LDH⁺-Assay durchgeführt, allerdings in an die Bedingungen der dreidimensionalen Zellkultur adaptierter Form. Die beiden Testsubstanzen sowie die Kontrollpartikel wurden 2 Tage nach Aussaat der Zellen zu den unterschiedlichen Prostatakarzinomsphäroiden pipettiert. 4 Tage nach Substanzzugabe wurde der LDH⁺-Assay ausgewertet. Dabei wurden zusätzlich zur Lysekontrolle weitere Substanzkontrollen durchgeführt (Daten nicht dargestellt), um eine Interaktion der Testsubstanzen mit den Reaktionslösungen des LDH⁺-Assays auszuschließen. Die Abbildungen 4.11 – 4.13 veranschaulichen, für jede Zelllinie einzeln, die Ergebnisse dieses Zellkulturassays in den Prostatakarzinomsphäroiden, wobei die Farbreaktion jeweils nach sieben Minuten gestoppt wurde. In den Tabellen 4.11 – 4.13 werden die zu den einzelnen Abbildungen korrespondierenden Absorptionswerte prozentual zur biologischen Kontrolle gezeigt.

Abb. 4.11 Ergebnisse des LDH⁺-Assays zum Nachweis einer etwaigen Induktion von Nekrose in Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie PC-3 durch Inkubation mit freier Zoledronsäure und PLCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Substanzzugabe 48h nach Aussaat der Zellen, Auswertung des LDH⁺-Assays 4 Tage nach Substanzzugabe.

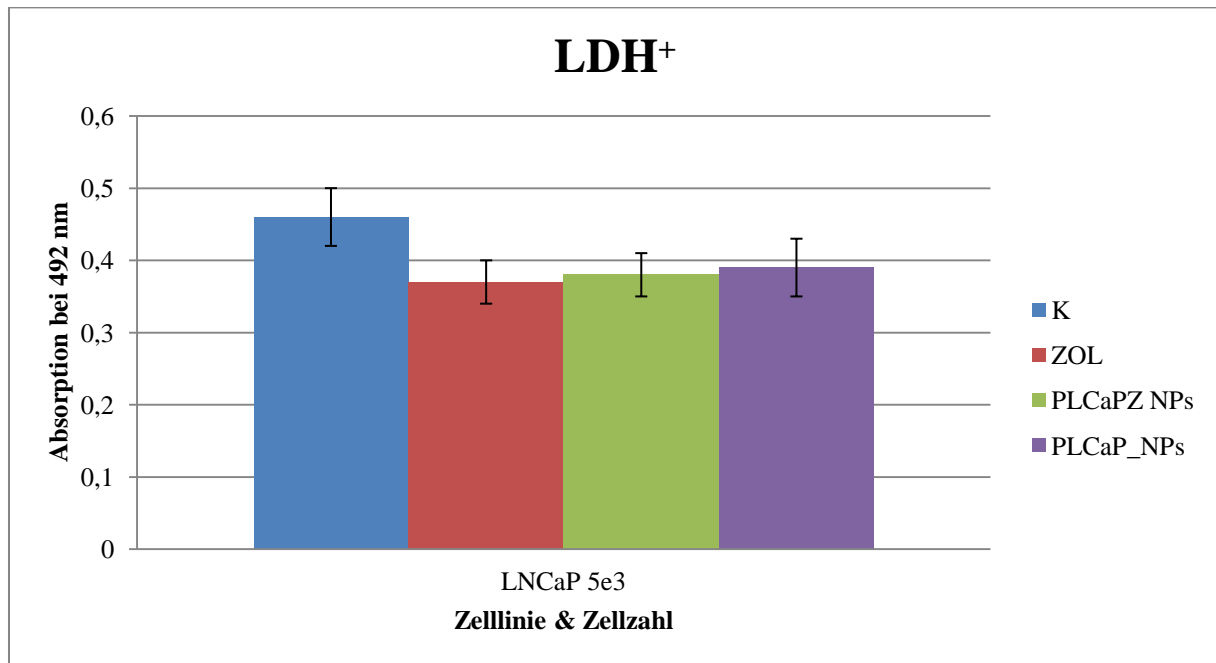


Tab. 4.11 Absorptionswerte aus Abb. 4.11 in [%] im Verhältnis zur mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Zelllinie Zellzahl | & K [%] | ZOL [20µM] [%] | PLCaPZ NPs [20µM] [%] | PLCaP_NPs [%] |
|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------------------|------------------|
| PC-3 5e ³ | 100 | 90 | 86 | 86 |

In PC-3-Homosphäroiden kann nach Inkubation mit 20µM freier Zoledronsäure keine Induktion von Nekrose spektrophotometrisch nachgewiesen werden. Der mittlere Absorptionswert beträgt im Vergleich zur biologischen Kontrolle nur 90%, d.h. es wird weniger LDH freigesetzt als von unbehandelten Zellen. Auch die Absorptionswerte der nanomodifizierten Zoledronsäure und der Kontrollpartikel betragen nur 86% der biologischen Kontrolle, weswegen kein Anhalt für eine verstärkte Freisetzung von LDH im Rahmen nekrotischen Zellunterganges vorliegt (Tab. 4.11).

Abb. 4.12 Ergebnisse des LDH⁺-Assays zum Nachweis einer etwaigen Induktion von Nekrose in Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie LNCaP durch Inkubation mit freier Zoledronsäure und PLCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Substanzzugabe 48h nach Aussaat der Zellen, Auswertung des LDH⁺-Assays 4 Tage nach Substanzzugabe.

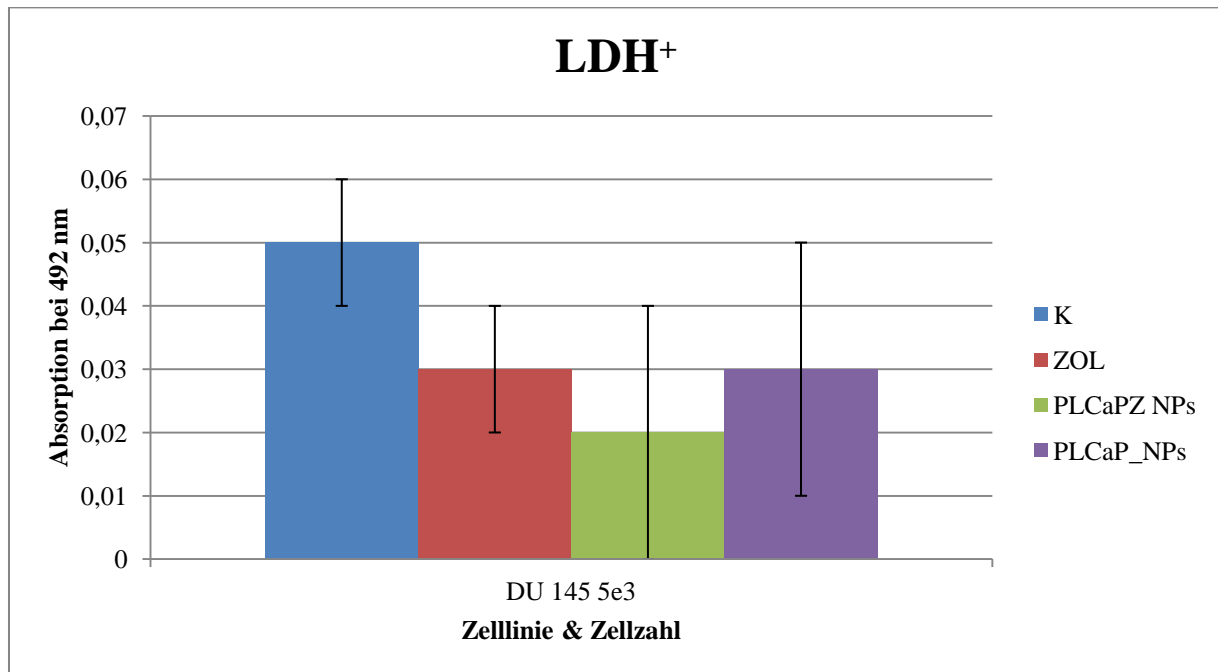


Tab. 4.12 Absorptionswerte aus Abb. 4.12 in [%] im Verhältnis zur mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Zelllinie Zellzahl | & | K [%] | ZOL [20µM] [%] | PLCaPZ NPs [20µM] [%] | PLCaP_NPs [%] |
|-----------------------|---|----------|----------------------|-----------------------------|------------------|
| LNCaP 5e ³ | | 100 | 80,4 | 82,6 | 84,8 |

Nahezu identische Ergebnisse wie für die Zelllinie PC-3 lassen sich auch für LNCaP-Sphäroide beobachten. Die mittleren Absorptionswerte für freie Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und PLCaP_NPs liegen mit 80%, 83% und 85% im Vergleich zur biologischen Kontrolle unter dem der unbehandelten Sphäroide, was für eine geringere Freisetzung an LDH und somit gegen eine Induktion von Nekrose spricht (Tab. 4.12). Die Absorptionswerte der nicht dargestellten Substanzkontrollen, welche zur Überprüfung einer potenziellen Interaktion der Testsubstanzen mit den Reaktionslösungen des LDH⁺-Assays durchgeführt wurden, liegen für PC-3- und LNCaP-Sphäroide zwischen 95% und 101% im Vergleich zur ebenfalls nicht abgebildeten Lysekontrolle (high control). Eine relevante Interaktion kann daher weitgehend ausgeschlossen werden.

Abb. 4.13 Ergebnisse des LDH⁺-Assays zum Nachweis einer etwaigen Induktion von Nekrose in Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie DU 145 durch Inkubation mit freier Zoledronsäure und PLCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Substanzzugabe 48h nach Aussaat der Zellen, Auswertung des LDH⁺-Assays 4 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.13 Absorptionswerte aus Abb. 4.13 in [%] im Verhältnis zur mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| Zelllinie Zellzahl | & | K [%] | ZOL [20µM] [%] | PLCaPZ NPs [20µM] [%] | PLCaP_NPs [%] |
|------------------------|---|----------|----------------------|-----------------------------|------------------|
| DU 145 5e ³ | | 100 | 60 | 40 | 60 |

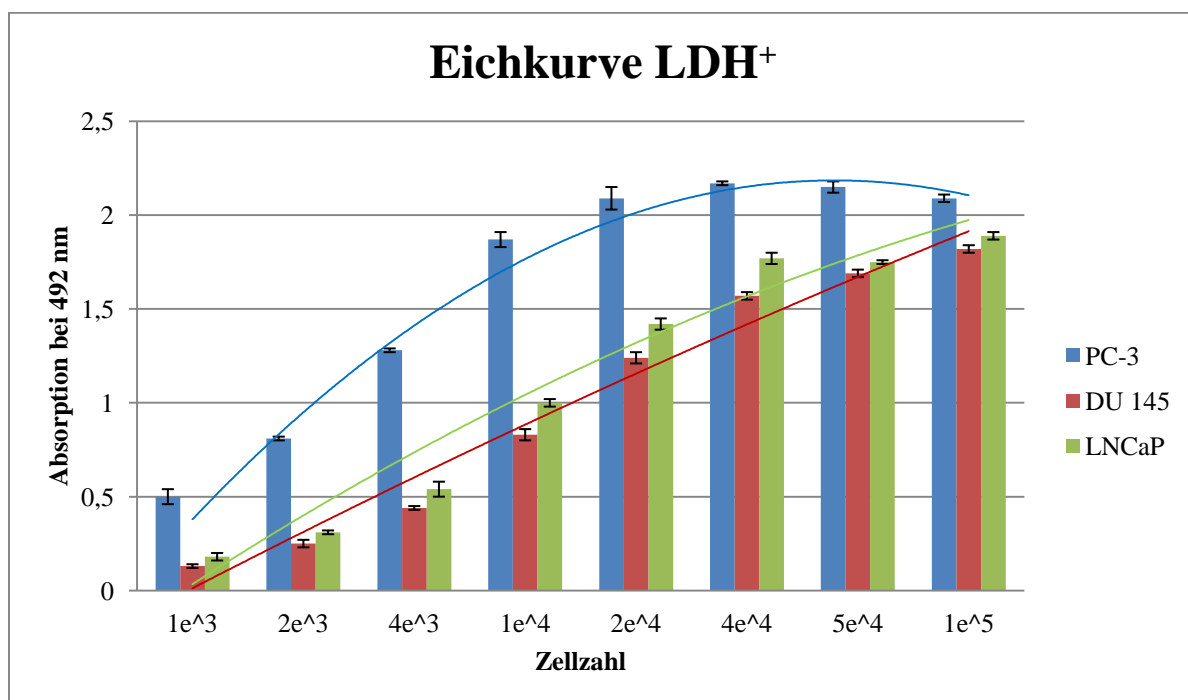
Ähnliche Ergebnisse wie in den beiden anderen Zelllinien werden auch für DU 145-Sphäroide beobachtet, wobei die absoluten Absorptionswerte zwischen 0,02 und 0,05 und somit wesentlich tiefer als bei PC-3- und LNCaP-Sphäroiden liegen. Für freie Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und PLCaP_NPs werden verglichen mit der biologischen Kontrolle relative Absorptionswerte von 60%, 40% und 60% gemessen. Durch die Behandlung mit diesen drei Substanzen wird folglich keine Nekrose induziert. Unter den Substanzkontrollen führen lediglich PLCaP_NPs im Vergleich zur Lysekontrolle (high control) zu einer Änderung der Absorption. Die spektrophotometrisch gemessenen Werte liegen für diese Substanz im Vergleich zur Lysekontrolle bei 125%.

Insgesamt kann im LDH⁺-Assay an Sphäroidkulturen von Prostatakarzinomzellen keine Induktion von Nekrose durch Inkubation mit freier Zoledronsäure bzw. PLCaPZ NPs nachgewiesen werden (Abb. 4.11 – 4.13).

Zur Quantifizierung der Zellproliferation in Sphäroiden wurde ebenfalls der LDH⁺-Assay verwendet. Dazu wurde wie im Methodikteil beschrieben vom Standardprotokoll abgewichen und der Versuchsablauf an die Anforderungen der Sphäroidkultur angepasst.

Zunächst wurde unter Verwendung des zweidimensionalen Zellkultursystems eine Eichkurve erstellt, in welcher für jede Zelllinie getrennt die freigesetzte LDH-Konzentration in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl dargestellt wird (Abb. 4.14). Die Farbreaktion wurde hierbei nach 4,5 Minuten gestoppt.

Abb. 4.14 Konzentration an aus Prostatakarzinomzellen der Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP freigesetzter LDH in Abhängigkeit von der Zellzahl nach maximaler Zelllyse mittels LDH⁺-Assay.

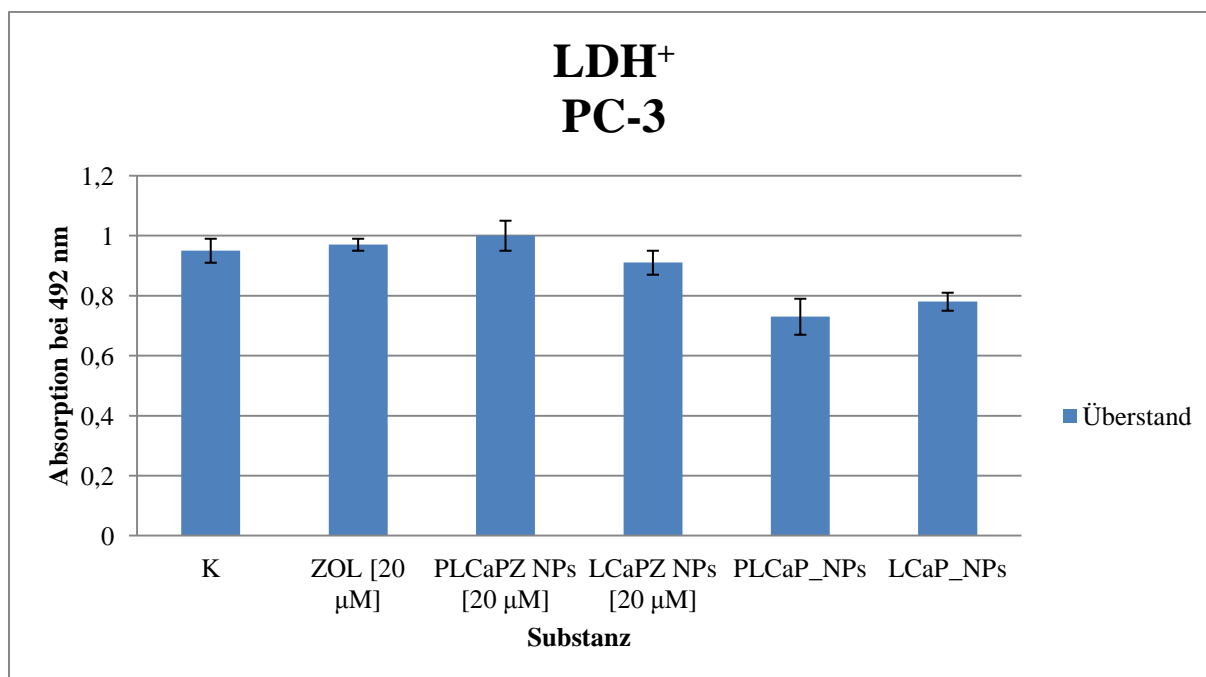


Die Ergebnisse zeigen, dass für Absorptionswerte zwischen 0 und 2 ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der freigesetzten Konzentration an LDH besteht. Dies wird insbesondere an den Graphen für DU 145- und LNCaP-Zellen deutlich. Für die Zelllinie PC-3 werden ab einer Zellzahl von $2e^4$ Absorptionswerte von über 2 gemessen. Ab diesem Bereich ist die lineare Beziehung der Daten weniger deutlich ausgeprägt. Dennoch kann auch für diese Zelllinie gezeigt werden, dass mit steigender Zellzahl im LDH⁺-Assay steigende Absorptionswerte gemessen werden (Abb. 4.14). Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde der LDH⁺-Assay zur Bestimmung der Zellproliferation innerhalb der Sphäroide genutzt.

Dazu wurden Absorptionswerte von Lysaten behandelter Tumorzellen mit denen der biologischen Kontrolle verglichen. Neben freier Zoledronsäure wurden die Sphäroide mit PLCaPZ NPs, LCaPZ NPs, PLCaP_NPs und LCaP_NPs inkubiert. Das Procedere der Auswertung eines solchen LDH⁺-Proliferationsassays an Sphäroiden soll hier exemplarisch für die Zelllinie PC-3 demonstriert werden. Die Substratreaktionen wurden hierbei jeweils nach 6 Minuten gestoppt.

Für jedes methodische Duplicate wurde die Konzentration an LDH sowohl im Lysat als auch im korrespondierenden Zellkulturüberstand der Sphäroide gemessen. Anhand der Absorptionswerte der Überstände konnte erneut untersucht werden, ob es durch die Inkubation mit den Testsubstanzen zu einer Induktion von Nekrose kommt (Abb. 4.15).

Abb. 4.15 Konzentration an LDH im Zellkulturüberstand von Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie PC-3 nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 5 Tage nach Substanzzugabe.



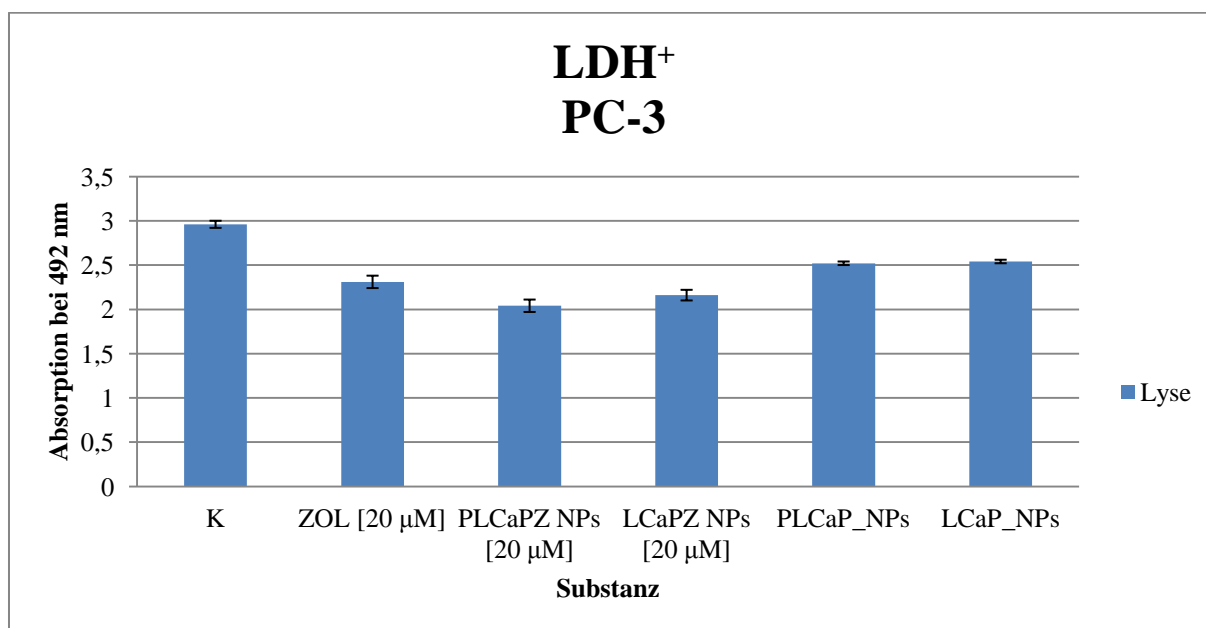
Tab. 4.14 Absorptionswerte aus Abb. 4.15 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

| PC-3 5e3 | K | ZOL [20 µM] [%] | PLCaPZ NPs [20 µM] [%] | LCaPZ NPs [20 µM] [%] | PLCaP_N Ps [%] | LCaP_N P [%] |
|-----------|-----|-----------------|------------------------|-----------------------|----------------|--------------|
| Überstand | 100 | 102,1 | 105,3 | 95,8 | 76,8 | 82,1 |

Die Absorptionswerte der Überstände zeigen, dass in Sphäroiden der Zelllinie PC-3 durch Inkubation mit den Testsubstanzen keine Nekrose induziert wird. Die Absorptionswerte der einzelnen Zoledronsäuremodifikationen und der biologischen Kontrolle sind nahezu identisch und betragen im Vergleich zu dieser 102% (freie Zoledronsäure), 105% (PLCaPZ NPs) und 96% (LCaPZ NPs). Für die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel werden, verglichen mit der biologischen Kontrolle, niedrigere Absorptionswerte gemessen, die für PLCaP_NPs bei 77% und für LCaP_NPs bei 82% liegen (Tab. 4.14).

Anschließend wurden die Zellen der PC-3-Homosphäroide lysiert, um eine maximale Freisetzung von LDH zu erreichen.

Abb. 4.16 Konzentration an LDH in Lysaten von Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie PC-3 nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 5 Tage nach Substanzzugabe.



Tab. 4.15 Absorptionswerte aus Abb. 4.16 in [%] im Verhältnis zur jeweiligen mit 100% gleichgesetzten biologischen Kontrolle

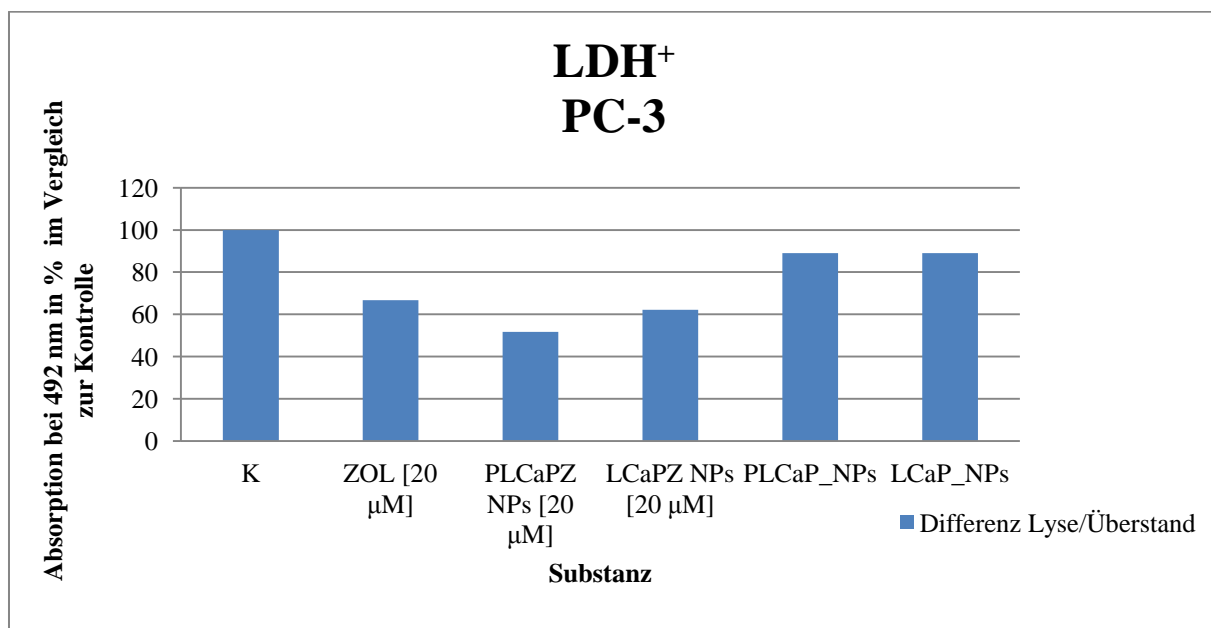
| PC-3 5e3 | K | ZOL [20 µM] [%] | PLCaPZ NPs [20 µM] [%] | LCaPZ NPs [20 µM] [%] | PLCaP_NPs [%] | LCaP_NPs [%] |
|----------|-----|-----------------|------------------------|-----------------------|---------------|--------------|
| Lyse | 100 | 78 | 68,9 | 73 | 85,1 | 85,8 |

Die Absorptionswerte der Lysate von biologischer Kontrolle und jeweiliger Testsubstanz, welche sich aus der im Überstand enthaltenen und durch Zelllyse freigesetzten LDH-Konzentration zusammensetzen, unterscheiden sich deutlich. Für die freie Zoledronsäure und

ihre beiden Nanomodifikationen werden niedrigere Absorptionswerte gemessen. Diese betragen im Verhältnis zur biologischen Kontrolle für die freie Zoledronsäure 78%, für PLCaPZ NPs 69% und für LCaPZ NPs 73%. Für die Kontrollpartikel liegen die Absorptionswerte verglichen mit der biologischen Kontrolle bei 85% (Tab. 4.15).

Um Rückschlüsse auf die Zellproliferation innerhalb der PC-3-Sphäroide ziehen zu können, durfte nur die aus vitalen Zellen freigesetzte Konzentration an LDH berücksichtigt werden. Diese wurde durch Subtraktion der Absorptionswerte der Überstände von denen der zugehörigen Lysate berechnet. Die für die biologische Kontrolle erhaltenen Absorptionswerte wurden gleich 100 Prozent gesetzt und die Absorptionswerte der einzelnen Substanzklassen in Prozent dazu graphisch dargestellt.

Abb. 4.17 Differenz der Konzentration an LDH von Lysaten und Überständen von Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie PC-3 in % im Vergleich zur biologischen Kontrolle nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 5 Tage nach Substanzzugabe.

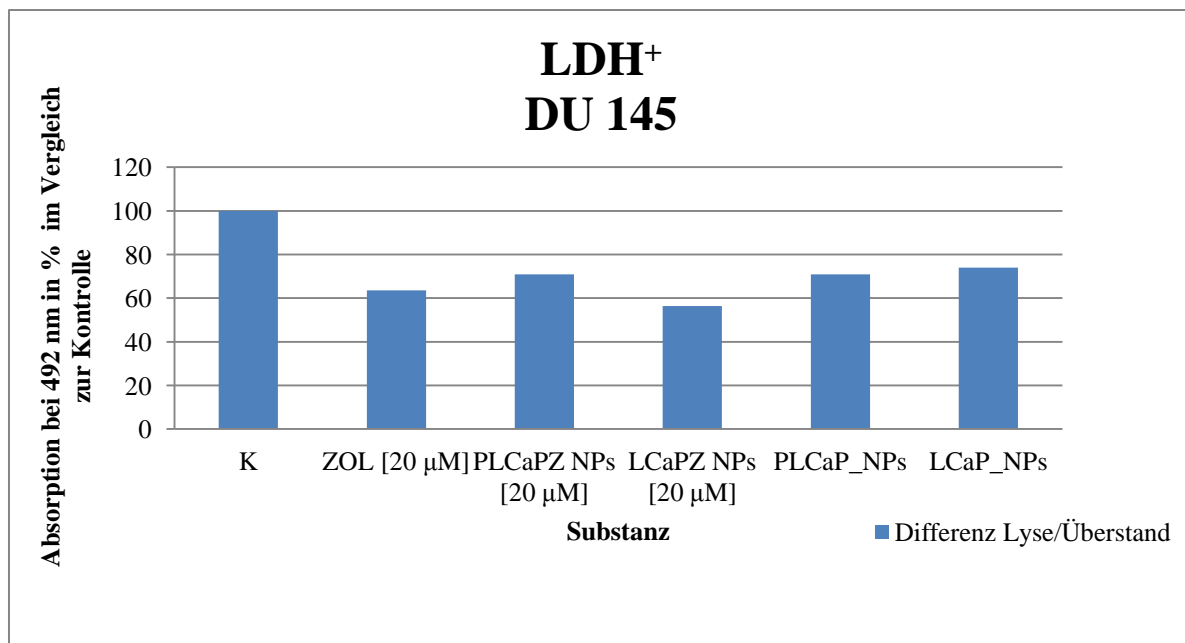


Aus den mit freier Zoledronsäure bzw. ihren Derivaten behandelten PC-3-Sphäroiden wird im Vergleich zur biologischen Kontrolle wesentlich weniger LDH durch Zelllyse freigesetzt, was auf eine geringere Zellzahl im Zuge einer Proliferationsinhibition innerhalb der behandelten Sphäroide rückschließen lässt. Für die freie Zoledronsäure bzw. LCaPZ NPs beträgt die aus den Prostatakarzinomzellen freigesetzte Konzentration an LDH im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der Kontrollsphäroide 66% bzw. 62%. Die stärkste Proliferationshemmung kann durch Inkubation mit PLCaPZ NPs erreicht werden, mit einer

Abnahme der Konzentration an freigesetzter LDH auf ca. 50% der Konzentration der biologischen Kontrolle (Abb. 4.17).

Die Abbildungen 4.18 und 4.19 stellen die entsprechenden Differenzen der LDH-Konzentrationen zwischen Lysaten und Überständen von DU 145- und LNCaP-Homosphäroiden nach Inkubation mit den Testsubstanzen und den zugehörigen Kontrollpartikeln dar. Die enzymatische Farbreaktion wurde hierbei nach 13 Minuten (DU 145) bzw. 6 Minuten (LNCaP) gestoppt.

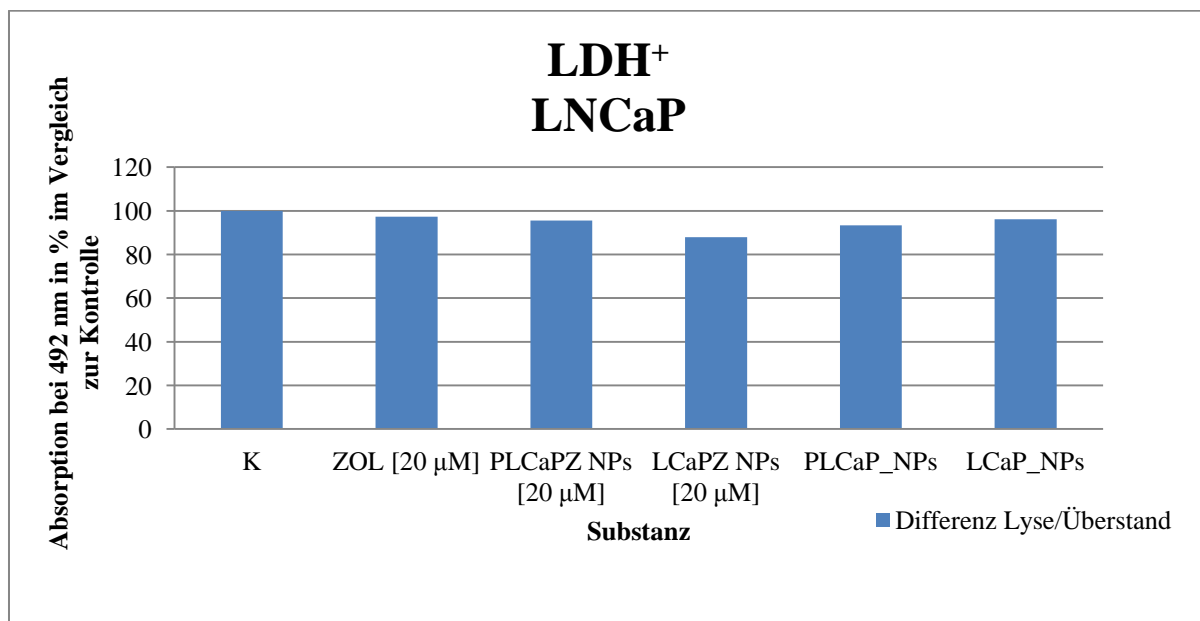
Abb. 4.18 Differenz der Konzentration an LDH von Lysaten und Überständen von Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie DU 145 in % im Vergleich zur biologischen Kontrolle nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 5 Tage nach Substanzzugabe.



In Sphäroiden der Zelllinie DU 145 führen alle applizierten Substanzen, auch die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel, zu einer Abnahme der Zellproliferation, sichtbar an der im Vergleich zur biologischen Kontrolle geringeren Freisetzung von LDH durch Zelllyse. Anders als in PC-3-Zellen wird in dieser Zelllinie die stärkste antiproliferative Wirkung durch eine Verpackung der Zoledronsäure in nicht pegylierte Nanopartikel erzielt. Für diese Nanomodifikation wird ein mittlerer Absorptionswert von weniger als 60% der biologischen Kontrolle gemessen. PLCaPZ NPs bewirken in Sphäroiden der Zelllinie DU 145 mit einem mittleren Absorptionswert von ca. 70% im Vergleich zur biologischen Kontrolle eine geringere Hemmung der Zellproliferation als die freie Zoledronsäure, für die ein Absorptionswert gemessen wird, der ca. 63% des Wertes der biologischen Kontrolle

entspricht (Abb. 4.18). Die Steigerung des zytotoxischen Potenzials der freien Zoledronsäure durch das Verpacken in nicht pegylierte Nanopartikel ist in dieser Zelllinie weniger stark ausgeprägt als die Wirkungssteigerung der freien Zoledronsäure durch Encapsulierung in PLCaPZ NPs in PC-3-Zellen.

Abb. 4.19 Differenz der Konzentration an LDH von Lysaten und Überständen von Prostatakarzinomsphäroiden der Zelllinie LNCaP in % im Vergleich zur biologischen Kontrolle nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 5 Tage nach Substanzzugabe.



Anders als bei den Zelllinien PC-3 und DU 145 kann in LNCaP Sphäroiden ein antiproliferativer Effekt durch Inkubation mit freier Zoledronsäure bzw. ihren Derivaten nur in sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden. Die stärkste Hemmung der Zellproliferation kann hierbei ebenso wie bei der Zelllinie DU 145 bei Verwendung von LCaPZ NPs nachgewiesen werden. Während die Absorptionswerte sämtlicher übriger Substanzen nahezu identisch mit dem der biologischen Kontrolle sind und sich im Vergleich zu dieser in einer Größenordnung zwischen 93% und 97% bewegen, beträgt der mittlere Absorptionswert für LCaPZ NPs 88% der biologischen Kontrolle (Abb. 4.19).

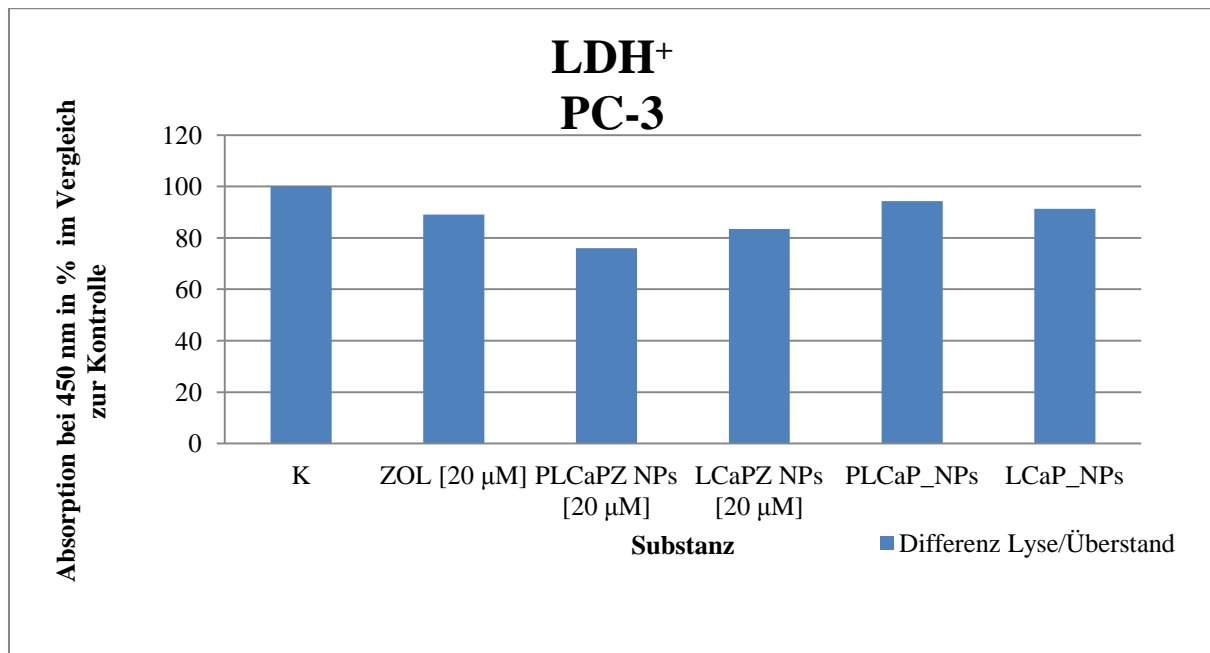
4.2.2 Heterosphäroide

Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}

Nach Inkubation mit den Zoledronsäurederivaten wurde auch an Heterosphäroiden in Analogie zu den Homosphäroiden ein LDH⁺-Proliferationsassay durchgeführt, dessen

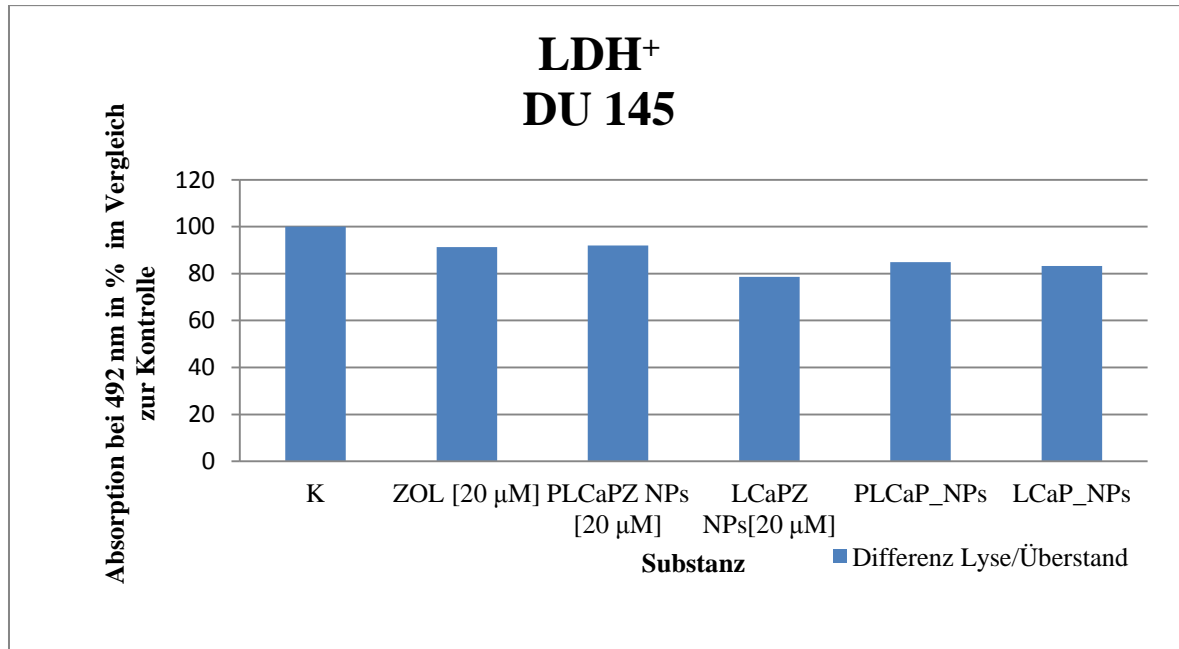
Ergebnisse in den Abbildungen 4.20 bis 4.22 dargestellt werden. Die Substratreaktionen wurden hierbei nach 6 Minuten (PC-3 und LNCaP) bzw. nach 10 Minuten (DU 145) gestoppt.

Abb. 4.20 Differenz der Konzentration an LDH in Lysaten und Überständen von Prostatakarzinomheterosphäroiden der Zelllinien PC-3 und PTF 54 in % im Vergleich zur biologischen Kontrolle nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 4 Tage nach Substanzzugabe.



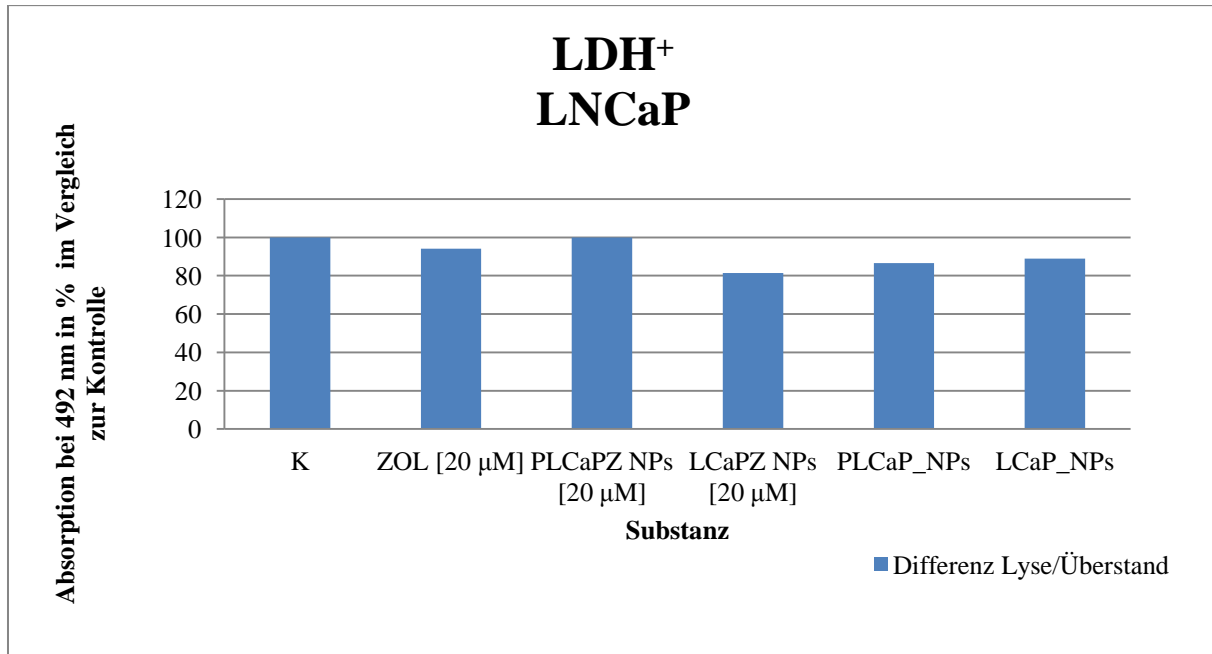
Die Absorptionswerte für freie Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs betragen im Vergleich zur biologischen Kontrolle 89%, 76% und 83%, woraus geschlussfolgert werden kann, dass es durch Behandlung mit besagten Substanzen zu einer Proliferationshemmung innerhalb der PC-3-Heterosphäroide gekommen ist. PLCaPZ NPs besitzen hierbei das stärkste antiproliferative Potenzial. Für die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel wird keine nennenswerte Inhibition der Zellproliferation innerhalb der PC-3-Heterosphäroide beobachtet. Die Absorptionswerte liegen bei 94% (PLCaP_NPs) bzw. 91% (LCaP_NPs) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 4.20).

Abb. 4.21 Differenz der Konzentration an LDH in Lysaten und Überständen von Prostatakarzinomheterosphäroiden der Zelllinien DU 145 und PTF 54 in % im Vergleich zur biologischen Kontrolle nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 4 Tage nach Substanzzugabe.



In DU 145-Heterosphäroiden führen sämtliche Substanzen, auch die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel, zu einer Abnahme der Zellproliferation. Diese ist für die freie Zoledronsäure und PLCaPZ NPs nur äußerst schwach ausgeprägt, sichtbar an Absorptionswerten um die 92% im Vergleich zur biologischen Kontrolle. Dabei inhibieren selbst PLCaP_NPs und LCaP_NPs mit einer Reduktion der Absorptionswerte auf 85% bzw. 83% im Vergleich zur biologischen Kontrolle die Proliferation in Heterosphäroiden dieser Zelllinie stärker. Die potenteste Proliferationshemmung in DU 145-Heterosphäroiden kann mit einem mittleren Absorptionswert von 79% im Verhältnis zur biologischen Kontrolle für LCaPZ NPs nachgewiesen werden (Abb. 4.21).

Abb. 4.22 Differenz der Konzentration an LDH in Lysaten und Überständen von Prostatakarzinomheterosphäroiden der Zelllinien LNCaP und PTF 54 in % im Vergleich zur biologischen Kontrolle nach Behandlung mit freier Zoledronsäure, PLCaPZ NPs und LCaPZ NPs in jeweils 20µM Konzentration. Verwendung von PLCaP_NPs und LCaP_NPs als Zoledronsäure-freie Kontrollpartikel. Zugabe der Testsubstanzen 48h nach Aussaat der Zellen, LDH⁺-Assay 4 Tage nach Substanzzugabe.



Ähnliche Ergebnisse wie für Heterosphäroide der Zelllinie DU 145 werden auch für LNCaP-Heterosphäroide beobachtet. Während PLCaPZ NPs mit einem im Vergleich zur biologischen Kontrolle identischen mittleren Absorptionswert zu keiner Inhibition der Zellproliferation in Heterosphäroiden dieser Zelllinie führen, kann durch die freie Zoledronsäure ebenfalls nur eine marginale Abnahme der Zellproliferation auf 95% verglichen mit den unbehandelten Heterosphäroiden bewirkt werden. Die Zoledronsäure-freien Kontrollpartikel bewirken ihrerseits eine Abnahme der Absorptionswerte auf 87% (PLCaP_NPs) bzw. 89% (LCaP_NPs). Der mit 81% niedrigste mittlere Absorptionswert und somit die stärkste Hemmung der Zellproliferation werden bei Inkubation der LNCaP-Heterosphäroide mit LCaPZ NPs beobachtet (Abb. 4.22).

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Enkapsulierung der freien Zoledronsäure in zwei unterschiedliche Nanovektoren auf ihr zytotoxisches Potenzial gegen Prostatakarzinomzellen und Prostatakarzinom-assoziierte Fibroblasten analysiert. Ferner wurde die Beeinflussung der Effizienz der verwendeten Formen der Zoledronsäure gegen Prostatakarzinomzellen durch Komponenten des Tumormicroenvironments untersucht. Hierzu wurden Zellkulturassays zum Nachweis der Zellviabilität sowie zur Detektion der grundlegenden Wirkmechanismen der einzelnen Testsubstanzen sowohl an adhärent wachsenden Zellkulturen als auch an dreidimensionalen Homo- und Heterosphäroiden durchgeführt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Zellkulturassays vor dem Hintergrund bereits publizierter Literatur diskutiert werden.

5.1 Zweidimensionale Zellkultur

5.1.1 Prostatakarzinomzellen

Effekt der Nanomodifikationen auf die Wirksamkeit der freien Zoledronsäure

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass durch ein Verpacken der freien Zoledronsäure in die beiden unterschiedlichen Nanopartikel ihre antitumorale Potenz gegen Prostatakarzinomzellen gesteigert werden kann. Das Ausmaß dieser Wirkungssteigerung ist hierbei sowohl von der verwendeten Zelllinie als auch von der Modifikation selbst abhängig. LCaPZ NPs führen im Vergleich zur freien Zoledronsäure nur in DU 145 und LNCaP-Zellen zu einer verstärkten Abnahme der Zellviabilität, während in PC-3-Zellen diese Nanomodifikation weniger effektiv ist als die Reinsubstanz. Die stärkste zytotoxische Wirkung innerhalb aller drei Zelllinien entfalten PLCaPZ NPs.

Während es in DU 145- und LNCaP-Zellen durch die Enkapsulierung der freien Zoledronsäure in PLCaPZ NPs zu einer deutlichen Steigerung ihrer antitumoralen Potenz kommt, ist dieser zusätzliche Vorteil in PC-3-Zellen nur wesentlich schwächer ausgeprägt. Dies liegt daran, dass in dieser Zelllinie bereits die freie Zoledronsäure zu einer erheblichen Abnahme der Zellviabilität führt, während in DU 145- und LNCaP-Zellen die freie Zoledronsäure deutlich schlechter wirkt. In Analogie zu diesen Beobachtungen wurden im Jahr 2011 die Ergebnisse einer Studie publiziert, die zeigten, dass die freie Zoledronsäure in hochmalignen PC-3-Prostatakarzinomzellen eine stärkere Wirkung entfaltet als in der niedrigmalignen Zelllinie LNCaP. (Almubarak H et al., 2011)

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass es zahlreiche Studien gibt, die für die freie Zoledronsäure eine antitumorale Wirkung nicht nur gegen Prostatakarzinomzellen, sondern gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen Tumorzellen *in vitro* belegen. Da durch die verwendeten Nanomodifikationen, insbesondere jedoch für PLCaPZ NPs, eine Potenzierung des zytotoxischen Potenzials der freien Zoledronsäure gegen Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden konnte, besteht Grund zu der Annahme, dass durch die Einkapsulierung der freien Zoledronsäure ähnlich positive Effekte auch gegen Zellen anderer Krebsentitäten *in vitro* bzw. *in vivo* erzielt werden könnten.

Von den italienischen Kooperationspartnern an der Universität von Neapel wurde demonstriert, dass die antitumorale Wirksamkeit der freien Zoledronsäure gegen Mamma-, Nierenzell-, Lungen- und Pankreaskarzinomzellen sowie Melanom- und Myelomzellen *in vitro* durch eine Verpackung in PLCaPZ NPs bzw. die bereits erwähnten „stealth liposomes“ der LipoZOL gesteigert werden kann. (Salzano G et al., 2011; Marra M et al., 2011) Zusätzlich konnte für die LipoZOL im Xenograft-Mausmodell für die multiple Myelomzelllinie OPM2 eine Potenzierung der zytotoxischen Effizienz der freien Zoledronsäure nachgewiesen werden. (Marra M et al., 2011)

In einem direkten Vergleich zwischen PLCaPZ NPs und LipoZOL konnte die Überlegenheit der sich selbst zusammensetzenden Nanopartikel in nahezu jeder Hinsicht belegt werden. Im Vergleich zur LipoZOL zeichnen sie sich durch eine größere Homogenität bezüglich der Verteilungsbreite ihrer Größe aus und können mit höherer Reproduzierbarkeit in puncto Durchmesser und morphologischer Eigenschaften hergestellt werden. Trotz ihrer geringeren Größe von 147nm beträgt die Fähigkeit der PLCaPZ NPs Zoledronsäure zu enkapsulieren das Zwölfwache der durchschnittlich mit 270nm wesentlich größeren „stealth liposomes“. Auch bezüglich Proliferationshemmung, Reduktion der Tumorgöße, Verlängerung des Gesamtüberlebens und Inhibition der Tumorneoangiogenese im PC-3-Xenograft-Mausmodell stellen die PLCaPZ NPs die potentere Nanomodifikation dar, was an ihrer geringeren Größe und somit einer besseren Penetrationsfähigkeit liegen könnte. Die Unterschiede zwischen LipoZOL und PLCaPZ NPs sind hierbei statistisch signifikant. Zu einer kompletten Remission und einer signifikanten Reduktion tumorassoziierter Makrophagen (TAMs) kam es ausschließlich unter Behandlung mit PLCaPZ NPs. Diese scheinen hierbei ihre Toxizität selektiv nur im Tumorgewebe zu entfalten, da Gefäßdichte und Anzahl der Makrophagen nur im Tumorgewebe abnahmen, während andere Gewebe verschont blieben. (Marra M et al., 2012).

Als weiteres Beispiel für die Potenzierung der antitumoralen Wirksamkeit der freien Zoledronsäure durch Verpacken in PLCaPZ NPs wurde von Porru et al. die Beobachtung gemacht, dass die Zoledronsäure erst nach ihrer Enkapsulierung in die pegylierten Nanopartikel einen antiproliferativen Effekt gegen Glioblastomzellen der Zelllinie U-373MG-LUC in vitro besitzt. In der verwendeten Zelllinie erwiesen sich PLCaPZ NPs hierbei als wesentlich effektivere Proliferationsinhibitoren als die zur Therapie des Glioblastoms bereits zugelassenen Chemotherapeutika Temozolomid und Fotemustin. Da sich die Zelllinie U-373MG-LUC unter anderem durch eine Überexpression des Transferrin-Rezeptors auszeichnet, wurden in einem nächsten Schritt die Nanopartikel der PLCaPZ NPs zusätzlich mit Transferrin gekoppelt. Während in vitro hierdurch kein weiterer Vorteil im Vergleich zu den normalen PLCaPZ NPs verzeichnet werden konnte, wurde im Xenograft-Mausmodell eine gesteigerte zytotoxische Aktivität nachgewiesen, welche von einer verstärkten Anreicherung der Transferrin-markierten Nanopartikel in den Tumoren im Vergleich zu normalen PLCaPZ NPs begleitet wurde. Im Gegensatz zu freier Zoledronsäure wurde somit für PLCaPZ NPs nicht nur generell eine Wirksamkeit gegen die verwendete Glioblastomzelllinie nachgewiesen, sondern diese Nanovektoren eröffneten aufgrund ihrer Modifizierbarkeit durch zum Beispiel das Anhängen von Liganden im Rahmen des aktiven „targeting“ die Möglichkeit einer weiteren Potenzierung ihrer antitumoralen Effizienz. (Porru M et al., 2014)

Vergleichbare in vivo Studien mit Tumorzellen, für die in vitro ein antitumoraler Effekt für die freie Zoledronsäure bzw. ihre unterschiedlichen Nanomodifikationen belegt werden konnte, könnten zur Klärung des potenziellen, zusätzlichen antitumoralen Nutzens einer Enkapsulierung der freien Zoledronsäure gegen besagte Tumorentitäten beitragen und gegebenenfalls Anstöße für die Entwicklung neuer Therapiestrategien liefern. In diesem Zusammenhang wären vor allem Experimente unter Verwendung von Bronchialkarzinom-, Pankreaskarzinom-, Mammakarzinom-, Melanom- und Osteosarkomzellen sinnvoll.

Die Modifikation der pharmakokinetischen Eigenschaften der Zoledronsäure mit Hilfe der Nanotechnologie hat sich allerdings nicht nur bei der Erforschung neuer Behandlungsmöglichkeiten von Malignomen bewährt. Für die LipoZOL liegen vielversprechende Ergebnisse vor, die für deren potenziellen Einsatz zur Behandlung neuropathischer Schmerzen sprechen. Bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielen sowohl Veränderungen der Bluthirnschranke (Echeverry S et al., 2011) als auch die Aktivierung von Gliazellen, insbesondere von Astrozyten, im Zuge von Nervenverletzungen

eine elementare Rolle. Aktivierte Astrozyten führen durch die Freisetzung proinflammatorischer Chemo- und Zytokine zu einer kontinuierlichen, Rezeptor-vermittelten Sensibilisierung von Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks, welche zur Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen beiträgt. (Hains BC et al., 2006) Im Rahmen ihrer Aktivierung verändern Astrozyten ihren Phänotyp, ferner kommt es zu deren verstärkter Migration zum Ort der Nervenschädigung. Von Zhuang et al. wurde auf Grundlage ihrer Studienergebnisse die Hypothese aufgestellt, dass für die Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen durch Astrozyten Stoffwechselprozesse, die durch die Mitogen-aktivierte Kinase ERK reguliert werden, von entscheidender Bedeutung sind. (Zhuang Z-Y et al., 2005) Da die Aktivierung der ERK ihrerseits durch die Prenylierung kleiner GTPasen der Ras-Familie kontrolliert wird und die Zoledronsäure eben diese posttranslationale Modifikation der G-Proteine über eine Inhibition der FPPS und GGPPS verhindern kann, stellt sie ein vielversprechendes Medikament zur Therapie neuropathischer Schmerzen dar. Selbst nach intravenöser Applikation der freien Zoledronsäure kann sie jedoch nur ca. ein bis zwei Stunden im Plasma nachgewiesen werden, bevor es zu einer starken und langanhaltenden Akkumulation im Knochen kommt. (Chen T et al., 2002) Die kurze Plasmahalbwertszeit der freien Zoledronsäure verhindert somit das Erreichen ausreichend hoher Wirkstoffspiegel im zentralen Nervensystem. Caraglia et al. konnten im Mausmodell des persistierenden neuropathischen Schmerzes zeigen, dass LipoZOL, jedoch nicht die freie Zoledronsäure, zu einer statistisch signifikanten Abnahme der mechanischen Überempfindlichkeit nach Nervenschädigung führt. Gleichzeitig kam es nur nach Behandlung mit LipoZOL, nicht jedoch mit der freien Zoledronsäure, zu einer Wiederherstellung einer normalen Zytoarchitektur im Bereich des Hinterhorns des Rückenmarks sowie zu einer verstärkten Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. (Caraglia M et al., 2013)

Ziel der Nanomodifikation der freien Zoledronsäure ist es, ihre starke Bindung an die Hydroxylapatitkristalle des Knochens und ihre dortige Akkumulation zu reduzieren, um somit ihre Plasmahalbwertszeit und ihre Bioverfügbarkeit in extraskelettalen Geweben zu erhöhen. Die Ergebnisse oben genannter Studien sprechen dafür, dass dies durch die Einkapsulierung in die genannten Nanovektoren möglich ist, wobei hierdurch gleichzeitig das zytotoxische Potenzial der freien Zoledronsäure gesteigert wird. Bislang weniger gut erforscht sind jedoch die Auswirkungen der genannten Modifikationen auf die unerwünschten Nebenwirkungen der Zoledronsäure. Speziell für die Verwendung von PLCaPZ NPs und LipoZOL im Xenograft-Mausmodell wurde berichtet, dass diese Formen der Zoledronsäure von den Mäusen gut toleriert wurden, da weder eine Gewichtsabnahme noch das Auftreten von toxisch bedingten

Todesfällen beobachtet wurden. (Marra M et al., 2011; Salzano G et al., 2011) Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren nach meiner Kenntnis jedoch keine weiterführenden Studienergebnisse, welche explizite Angaben über das Nebenwirkungsprofil der genannten und von mir verwendeten Zoledronsäuremodifikationen machen könnten. Dabei wären vor allem die Auswirkungen der Modifikationen auf die häufigste unerwünschte Arzneimittelwirkung der Zoledronsäure, die Entstehung von Kieferosteonekrosen, von besonderem Interesse. Hierzu könnten zum Beispiel Zellkulturassays an Zahnfleischfibroblasten oder Osteozyten unter Verwendung freier Zoledronsäure und entsprechender Nanomodifikationen durchgeführt werden. Auch das nephrotoxische Potenzial der unterschiedlichen Zoledronsäuremodifikationen sollte näher untersucht werden.

Wirkprinzip der Zoledronsäure und ihrer Nanomodifikationen

Hinsichtlich des vorherrschenden Wirkmechanismus der freien Zoledronsäure in den permanenten Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP liegen je nach Publikation zum Teil widersprüchliche Studienergebnisse vor. Dafür kann unter anderem die genetische Langzeitinstabilität dieser Tumorzelllinien verantwortlich gemacht werden. (Wang H et al., 2006) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit indizieren, dass für die im WST-1-Assay beobachtete Viabilitätsabnahme der Prostatakarzinomzellen am ehesten eine Proliferationsinhibition verantwortlich ist. Eine relevante Induktion von Apoptose bzw. in geringerem Umfang auch Nekrose konnte nur für die Zelllinie PC-3 nachgewiesen werden, obwohl auch für die beiden anderen Zelllinien im LDH⁺-Assay und CDD⁺-Assay erhöhte Absorptionswerte nach Inkubation mit freier Zoledronsäure gemessen wurden, welche theoretisch für eine Induktion von Nekrose und Apoptose sprechen würden. Diese Ergebnisse sollten jedoch kritisch hinterfragt werden, da in den beiden zuletzt genannten Zelllinien die absolut gemessenen Absorptionswerte so niedrig waren, dass prozentual betrachtet relevante Veränderungen schon durch Schwankungen um 0,01 vorgetäuscht werden könnten, welche auch im Rahmen von Messungenauigkeiten auftreten können.

Vergleichbare Daten wurden von Lee et al. erhoben. Für dieselben Zelllinien, die auch von mir verwendet wurden, konnte illustriert werden, dass die freie Zoledronsäure in einer Konzentration von 25µM einen dramatischen inhibitorischen Effekt auf deren Zellproliferation hat, mit konsekutivem Zellzyklusarrest besagter Zellen in der G0-G1- und S-Phase, während selbst hohe Zoledronsäurekonzentrationen von 100µM keinen Zelltod induzierten. (Lee MV et al., 2001)

Dem gegenüber wurde von Coxon et al. nach 24-stündiger Inkubation der Zelllinie PC-3 mit Zoledronsäure in einer Konzentration von 100µM bzw. nach 72-stündiger Inkubation der Zelllinie DU 145 mit 1µM Zoledronsäure eine Induktion von Apoptose beobachtet. (Coxon JP et al., 2004) Entgegen früherer Annahmen, die der Inhibition der FPPS die entscheidende Bedeutung für die Induktion von Apoptose in DU 145-Zellen durch Hemmung der Prenylierung der GTPase Ras mit konsekutiver Störung der Ras/MAPK/ERK-Signalskaskade und Aktivierung der Caspase-3 beimaßen (Oades GM et al., 2003), konnten Coxon et al. beweisen, dass die Inhibition der GGPPS hierfür wichtiger ist. Ferner wurde gezeigt, dass durch eine Behandlung der Prostatakarzinomzelllinien DU 145 und PC-3 mit freier Zoledronsäure deren Fähigkeit zur Adhäsion auf mineralisierter Matrix reduziert wird, wobei hierfür im Vergleich zur Induktion von Apoptose bereits niedrigere Zoledronsäurekonzentrationen von 1µM ausreichen. Auch für die Inhibition der Adhäsion auf mineralisierter Matrix war die Hemmung der GGPPS von entscheidenderer Bedeutung als eine Hemmung der FPPS. (Coxon JP et al., 2004)

Auch Marra et al. konnten belegen, dass der Effekt einer verminderten Adhäsion von PC-3- und DU 145-Zellen an extrazellulären Matrixkomponenten auf dem Eingreifen der freien Zoledronsäure in den Mevalonatweg beruht. Ihren Ergebnissen zufolge führt die Zoledronsäure über eine reduzierte Aktivierung der Ras-Raf-1- und Akt-Signalkaskade zur verminderten Transkription von cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61), welcher die Adhäsion von Tumorzellen an extrazellulärer Matrix fördert. Zusätzlich konnte die Beobachtung einer verminderten Fähigkeit besagter Zelllinien zu Migration und Invasion auf eine verminderte Expression von CYR61 zurückgeführt werden. (Marra M et al., 2009)

Wie bereits erwähnt wurde von Almubarak et al. publiziert, dass die freie Zoledronsäure dosisabhängig in Konzentrationen zwischen 0,25µM und 10µM gegen hochtumorigene PC-3-Prostatakarzinomzellen stärker wirkt als gegen niedrigtumorigene LNCaP-Zellen. Während es in PC-3 Zellen durch Behandlung mit Zoledronsäure sowohl zu einer Inhibition der Zellproliferation als auch zur Induktion von Apoptose kam, konnten ähnliche Effekte in der niedrigmalignen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP nicht oder nur in abgeschwächtem Ausmaß bzw. erst bei Applikation höherer Zoledronsäurekonzentrationen nachgewiesen werden. Dabei konnten zwischen beiden Zelllinien deutliche Unterschiede bezüglich des Genexpressionsmusters detektiert werden. Zu einer Hochregulierung pro-apoptotischer Proteine wie Bax und der Caspasen 2, 3, 7 und 9 bzw. einer verminderten Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, BIRC3 und Survivin kam es nur in den hochtumorigenen PC-3-

Zellen. (Almubarak H et al., 2011) Diese Ergebnisse sind kongruent zu den hier vorgestellten Beobachtungen, denen zu Folge nur in PC-3-Zellen, jedoch nicht in LNCaP-Zellen durch eine Behandlung mit Zoledronsäure Apoptose induziert werden konnte.

Einen weiteren antitumoralen Wirkmechanismus der Zoledronsäure stellt die Induktion des Zelltodes von Prostatakarzinomzellen durch Autophagie dar. (Lin J-F et al., 2011) Autophagie ist ein physiologischer Mechanismus der Zellhomöostase, über den Zellen im Falle von Stress- oder Mangelzuständen Zytoplasmakomponenten recyceln und sich überschüssiger oder defekter Zellorganellen entledigen können. Sie dient gleichzeitig dem Zellschutz und der Aufrechterhaltung einer normalen Zellfunktion, kann jedoch auch an der Entstehung und dem Voranschreiten von Krankheiten beteiligt sein. (Shintani T et al., 2004) Während Autophagie in frühen Tumorstadien eher der Tumorsuppression dient, kann sie in fortgeschrittenen Stadien einen weiteren Tumorprogress unterstützen, indem sie die Toleranz der Tumorzellen gegenüber niedriger Sauerstoff- und Nährstoffkonzentrationen steigert. Durch eine Inhibition der Induktion von Apoptose kann Autophagie in bestimmten Tumorzellen zur Chemotherapeutikaresistenz beitragen. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Tumorzelllinien auch ein Zelltod durch Autophagie nach Applikation von Chemotherapeutika wie z.B. dem m-TOR-Inhibitor Rapamycin beobachtet. Autophagie wird hauptsächlich über den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg induziert. (Kondo Y et al., 2005) Über die Ras-MEK-ERK-Signalkaskade ist jedoch auch eine AKT-unabhängige Aktivierung von m-TOR möglich, wobei der GTPase Ras eine mehrdeutige Bedeutung bei der Regulation von Autophagie zukommt. (Rosenfeldt MT et al., 2009) Im Gegensatz zu PC-3- und LNCaP-Zellen konnte von Lin et al. in der Zelllinie DU 145 nach Inkubation mit 100µM Zoledronsäure kein Nachweis einer Induktion von Autophagie erbracht werden. Als möglicher Grund hierfür wurde eine verstärkte Expression des Tumorsuppressorproteins p53 durch DU 145-Zellen genannt. (Lin J-F et al., 2011) Das auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnete Protein p53 spielt im Zusammenhang mit der Autophagie je nach seiner intrazellulären Lokalisation ebenfalls eine unterschiedliche Rolle. Während nukleäres p53 über eine Aktivierung von Zielgenen im Zellkern zu einer verstärkten Induktion von Autophagie führt, unterdrückt im Zytoplasma befindliches p53 diese. (Maiuri MC et al., 2010)

Die vorliegenden Ergebnisse geben keinen Anhalt dafür, dass durch die Nanomodifikationen der freien Zoledronsäure neue Wirkmechanismen erschlossen werden würden, wobei eingeräumt werden muss, dass keine Zellkulturassays zum Nachweis von Nekrose durchgeführt wurden. Stattdessen wurde lediglich eine Potenzierung der Wirkung der freien

Zoledronsäure, insbesondere durch Enkapsulierung in PLCaPZ NPs, beobachtet. Apoptose nennenswerten Ausmaßes wurde nur in der Zelllinie PC-3 induziert, während als Hauptwirkmechanismus der Nanomodifikationen in allen drei Zelllinien in Analogie zur Reinsubstanz eine starke Proliferationshemmung eruiert werden konnte. Auch von den italienischen Kooperationspartnern wurde die zytotoxische Wirkung der PLCaPZ NPs gegen die untersuchten Tumorzellen auf eine potente Proliferationsinhibition zurückgeführt. (Salzano G et al., 2011)

5.1.2 Fibroblasten

Effekt der Nanomodifikationen auf die Wirksamkeit der freien Zoledronsäure und Wirkprinzip der einzelnen Substanzen

Im direkten Vergleich zu den Prostatakarzinomzellen reagierten die tumorassoziierten Fibroblasten wesentlich empfindlicher auf die freie Zoledronsäure. Bereits für eine Zoledronsäurekonzentration von $5\mu\text{M}$, welche einem Viertel der in den Prostatakarzinomzellen verwendeten entspricht, konnte im WST-1-Assay eine starke Abnahme der Zellviabilität dokumentiert werden. Dabei wurden für Konzentrationen zwischen $0,5\mu\text{M}$ und $2\mu\text{M}$ höhere Absorptionswerte als bei den jeweiligen biologischen Kontrollen gemessen. Wie sich später herausstellen sollte, kam es auch in den Prostatakarzinom-assoziierten Fibroblasten durch Inkubation mit freier Zoledronsäure und ihren beiden Nanomodifikationen zu einer potenten Proliferationsinhibition. Unter der Annahme, dass es in den Wells der biologischen Kontrollen zu einer Abnahme der Zellviabilität durch Konfluens und dadurch bedingte Kontaktinhibition gekommen ist, könnten die für die niedrigsten Zoledronsäurekonzentrationen beobachteten und im Vergleich zu den biologischen Kontrollen höheren Absorptionswerte darauf zurückgeführt werden, dass es durch die niedrigen Zoledronsäurekonzentrationen ebenfalls zu einer sehr geringen Abnahme der Zellproliferation kam. Hierdurch wäre die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens und somit eine Abnahme der Zellviabilität durch Kontaktinhibition verhindert worden. Der Effekt der Nanomodifikationen auf die zytotoxische Potenz der freien Zoledronsäure gegen tumorassoziierte Fibroblasten war auch hier sowohl von der entsprechenden Primärzellkultur als auch von der jeweiligen Nanomodifikation abhängig. Während die aus der tumorfreien Region des Prostataektomiepräparates stammenden PNF 29-Fibroblasten auf die freie Zoledronsäure empfindlicher reagierten und es in dieser Zelllinie durch die Enkapsulierung der Zoledronsäure in die beiden Nanovektoren zu keiner weiteren Wirkungssteigerung kam, führten in PTF 54-Zellen, ähnlich wie in DU 145- und LNCaP-

Prostatakarzinomzellen, die beiden Nanomodifikationen zu einer stärkeren Abnahme der Zellviabilität im WST-1-Assay als die freie Zoledronsäure. Dabei erwiesen sich auch hier PLCaPZ NPs als die effizientere Nanomodifikation. Insgesamt sprachen die aus der tumortragenden Region der Prostata stammenden PTF 54-Fibroblasten schlechter auf die einzelnen Terstsubstanzen an, als die PNF 29-Fibroblasten. Die, in Analogie zu den Prostatakarzinomzelllinien DU 145 und LNCaP, ausschließlich für die PTF 54-Fibroblasten beobachtete Wirkungssteigerung der freien Zoledronsäure durch Enkapsulierung in die besagten Nanovektoren könnte ein Hinweis darauf sein, dass es durch Wechselwirkungen zwischen Tumorepithelzellen der Prostata und Prostatakarzinom-assoziierten Fibroblasten zu einer Coevolution der beiden Zellarten kommt, was sich unter anderem auch in einem vergleichbaren Ansprechen auf Chemotherapeutika äußert.

Vor dem Hintergrund, dass in den Prostatakarzinomzellen die Wirkung der Substanzen hauptsächlich auf eine Proliferationshemmung zurückzuführen war, wurde in den tumorassoziierten Fibroblasten direkt der BrdU-Assay zwecks Nachweis einer Proliferationsinhibition angewendet. Wenngleich keine Zellkulturassays zum Nachweis von Nekrose und Apoptose durchgeführt wurden, sprechen die Ergebnisse des BrdU-Assays dafür, dass auch in den tumorassoziierten Fibroblasten eine Hemmung der Zellproliferation von entscheidender Bedeutung für die im WST-1-Assay beobachtete Abnahme der Zellviabilität ist, da für alle Formen der Zoledronsäure ein fast vollständiges Sistieren der Zellproliferation beobachtet werden konnte.

Im Vergleich zu der Vielzahl an Publikationen, die über die zytotoxische Wirkung der Zoledronsäure gegen Tumorepithelzellen unterschiedlicher Malignome in vitro veröffentlicht wurden, existieren nur relativ wenige Studien, die den Effekt dieses Bisphosphonates auf Fibroblasten untersucht haben. Die meisten dieser Studien wurden durchgeführt, um die Pathogenese der häufigsten Nebenwirkung einer Zoledronsäuretherapie, das Auftreten von Kieferosteonekrosen, zu klären. Da Bisphosphonate allgemein die Knochenresorption durch Osteoklasten hemmen, ging man lange Zeit davon aus, dass die Entstehung von Kieferosteonekrosen im Zuge einer Zoledronsäuretherapie ursächlich durch eine Störung des Knochenstoffwechsels bedingt ist und somit eine Erkrankung primär nur des Knochens darstellt. Die Ergebnisse von Scheper et al. legten jedoch nahe, dass auch die Beeinflussung von Zellen der Mundmukosa durch die Zoledronsäure für die Entwicklung von Kieferosteonekrosen mit verantwortlich ist. So konnte unter anderem für menschliche Zahnfleischfibroblasten der Zelllinie HGF eine dosisabhängige Induktion von sowohl

extrinsischer als auch intrinsischer Apoptose durch Applikation von Zoledronsäure nachgewiesen werden. Die verwendeten Konzentrationen lagen hierbei zwischen 0,25µM und 3µM. Für 1µM und 3µM Zoledronsäure wurde ferner eine Proliferationshemmung von HGF-Zellen beobachtet. Der Vergleich des Genexpressionsmusters zwischen mit Zoledronsäure behandelten HGF-Zellen und unbehandelten Zellen der gleichen Linie zeigte hierbei, dass eine Vielzahl von Genen, die an der Regulation von Apoptose beteiligt sind, unterschiedlich exprimiert werden, darunter die Gene für Bcl-2, Survivin und Caspasen. Durch die Behandlung mit Zoledronsäure kam es zu einer verminderten Expression von Survivin während gleichzeitig eine erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 9 nachgewiesen werden konnte. (Scheper MA et al., 2009) Nahezu die gleichen Veränderungen bezüglich des Genexpressionsmusters wurden auch von Almubarak et al. in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 nach Applikation von freier Zoledronsäure beobachtet. (Almubarak H et al., 2011) Auch für die Proliferationshemmung scheinen die Caspasen 3 und 9 eine fundamentale Rolle zu spielen, da demonstriert wurde, dass durch siRNAs, die gegen die beiden genannten Caspasen gerichtet sind, die Zahnfleischfibroblasten ihre Fähigkeit zur Proliferation wiedererlangen. (Scheper MA et al., 2009) Obwohl in der vorliegenden Arbeit Primärkulturen von Fibroblasten aus Prostatektomiepräparaten verwendet wurden, bekräftigen diese Ergebnisse die Beobachtung, dass es durch die Behandlung tumorassoziierter Fibroblasten mit freier Zoledronsäure zu einer potenten Proliferationshemmung kommt, während sie gleichzeitig Grund zu der Annahme geben, dass abgesehen davon auch die Induktion von Apoptose einen relevanten Wirkmechanismus darstellen könnte. Basso et al. konnten, ebenfalls für HGF-Zellen, belegen, dass die freie Zoledronsäure in 5µM Konzentration, welche in der Mundhöhle von damit behandelten Patienten nachgewiesen werden konnte, zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl vitaler Zellen führt. Die Abnahme der Zellviabilität wurde hierbei von schweren morphologischen Veränderungen wie einer Schrumpfung des Zytoplasmas und einer verminderten Adhärenz der Zellen auf ihrer Zellkulturunterlage begleitet. (Basso FG et al., 2013) In Analogie hierzu steht die im WST-1-Assay nachgewiesene Reduktion der Zellviabilität Prostatakarzinom-assoziierter Fibroblasten durch Inkubation mit freier Zoledronsäure in identischer Konzentration von 5µM. Dass die freie Zoledronsäure nicht nur in Zahnfleischfibroblasten und Prostatakarzinom-assozierten Fibroblasten zytotoxisch wirkt, konnten McLeod et al. beweisen. Auch in fetalen Vorhautfibroblasten der Zelllinie HFFF2 führte 5µM Zoledronsäure zu einer Abnahme der Zellproliferation. (McLeod NMH et al., 2014)

Die genannten Studien demonstrieren im Einklang mit den eigenen Ergebnissen, dass die Zoledronsäure nicht nur gegen Tumorepithelzellen, sondern auch gegen Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft zytotoxisch wirkt. Hinsichtlich der Auswirkung der in dieser Arbeit verwendeten Nanomodifikationen auf das zytotoxische Potenzial gegen Fibroblasten lagen keine weiteren Studienergebnisse vor. Da zumindest für PTF 54-Zellen jedoch eine zusätzliche Potenzierung der Wirksamkeit der freien Zoledronsäure durch Nanomodifikation nachgewiesen werden konnte, stellen vor allem PLCaPZ NPs eine vielversprechende Substanz für die Therapie insbesondere des CRPC dar, da sie gleichermaßen gegen Tumorepithelzellen als auch tumorassoziierte Fibroblasten als Komponente des Tumormicroenvironments innerhalb des Prostatakarzinoms wirken. Gleichzeitig gilt es allerdings zu bedenken, dass durch die Enkapsulierung der freien Zoledronsäure in PLCaPZ NPs ihre Affinität zu den Hydroxylapatitkristallen des Knochens gesenkt und somit ihre Bioverfügbarkeit im extraskelletalen Gewebe erhöht werden soll. Da jedoch darauf hingewiesen wurde, dass für die Entstehung von Kieferosteonekrosen nicht nur die Interferenz der Zoledronsäure mit den Osteoklasten verantwortlich ist, sondern auch Wechselwirkungen mit Zellen der oralen Mukosa hieran beteiligt sind, sollte wie bereits angeraten überprüft werden, welche Auswirkungen eine Erhöhung der extraskelletalen Verfügbarkeit der Zoledronsäure auf die Entwicklung dieser Nebenwirkung hat.

5.2 Dreidimensionale Zellkultur

5.2.1 Homosphäroide

Obwohl nicht auf exakte Zellzahlen zurückgeschlossen werden kann, sprechen die Ergebnisse des als Proliferationsassay durchgeführten LDH⁺-Assays dafür, dass - in Analogie zum zweidimensionalen Zellkultursystem - die zytotoxische Wirkung der Zoledronsäure gegen Prostatakarzinomspäroide auf eine Inhibition der Zellproliferation zurückgeführt werden kann.

Im CDD⁺-Assay konnte allenfalls für PC-3-Zellen eine marginale Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Besonders in dieser Zelllinie fielen hierbei im Vergleich zur Positivkontrolle bereits für die biologische Kontrolle sehr hohe Absorptionswerte auf. Dies könnte Ausdruck der erfolgreichen Simulation einer dreidimensionalen, gewebeähnlichen Zytoarchitektur sein, da in vivo sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen die Zellzahl innerhalb von Organen ständig durch Apoptose reguliert wird. (Kerr JF et al., 1972) In den Zelllinien DU 145 und LNCaP konnte nicht nur keinerlei Induktion von Apoptose detektiert werden. Die Absorptionswerte der mit den einzelnen

Zoledronsäureformen behandelten Sphäroide lagen sogar unterhalb denen der jeweiligen biologischen Kontrolle. Da später verdeutlicht werden konnte, dass die Zoledronsäurederivate zu einer Proliferationshemmung innerhalb der Prostatakarzinomzellsphäroide führen, könnten die im Vergleich zu den biologischen Kontrollen niedrigeren Absorptionswerte Ausdruck einer geringeren Zellproliferation mit konsekutiv niedrigeren Zellzahlen innerhalb der Sphäroide sein. Folglich könnte von einem geringeren Ausmaß an Apoptose innerhalb der behandelten Sphäroide durch physiologische Organisationsvorgänge ausgegangen werden, was die niedrigeren Absorptionswerte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der biologischen Kontrollen erklären würde.

Anders als im zweidimensionalen Zellkultursystem konnte in PC-3-Sphäroiden durch Inkubation mit Zoledronsäure bzw. den beiden Nanomodifikationen keine Induktion von Nekrose mittels LDH⁺-Assay nachgewiesen werden. Tatsächlich waren die für die freie Zoledronsäure bzw. ihre Nanomodifikationen gemessenen Absorptionswerte aller drei Zelllinien nahezu identisch zu denen der entsprechenden biologischen Kontrolle, oder lagen - insbesondere für DU 145-Zellen - sogar tiefer. Hierbei wurde, ähnlich wie für den CDD⁺-Assay, jedoch bereits für die biologischen Kontrollen im Vergleich zu adhärent wachsenden Zellen eine erhöhte Freisetzung von LDH beobachtet. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die meisten Tumorzellsphäroide jenseits einer kritischen Größe von 500µM ein nekrotisches Zentrum aufweisen, an das sich ein Wall ruhender, aber vitaler Zellen sowie eine äußere Schicht proliferierender Zellen anschließen. (Kunz-Schughart LA et al., 1998) Die im Vergleich zu den biologischen Kontrollen des adhärenen Zellkultursystems erhöhten Konzentrationen an LDH im Zellkulturüberstand der Kontrollsphäroide könnten daher durch die Freisetzung von LDH aus nekrotischen Zellen im Inneren der Sphäroide bedingt sein. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass dieser zonale Aufbau der Sphäroide mit einem nekrotischen Zentrum multifaktoriell bedingt ist, wobei besondere Bedeutung wohl vor allem dem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen sowie einem niedrigen pH-Wert und der Akkumulation von Stoffwechselprodukten zukommt. (Acker H et al., 1987a; Acker H et al., 1987b; Carlsson J et al., 1988) Es konnte bewiesen werden, dass die Limitierung der Diffusionsstrecke für Sauerstoff für den zonalen Aufbau der Sphäroide entscheidender ist, als die Begrenzung des Glucosetransportes. (Venkatasubramanian R et al., 2006) Da im Rahmen dieser Arbeit belegt werden konnte, dass es in den Prostatakarzinomsphäroiden durch Inkubation mit den unterschiedlichen Formen der Zoledronsäure zu einer Proliferationshemmung gekommen ist, könnten die für die Testsubstanzen gemessenen und im Vergleich zu den biologischen Kontrollen niedrigeren Konzentrationen an LDH im

Zellkulturüberstand Ausdruck einer geringeren Zellzahl innerhalb der Sphäroide sein, deren Nähr- und Sauerstoffversorgung weniger stark kompromittiert wäre. Konsekutiv würden weniger Zellen durch Nekrose zu Grunde gehen, was die niedrigeren Konzentrationen an LDH im Zellkulturüberstand erklären würde.

Bezüglich der Effizienz der einzelnen Substanzen fiel auf, dass auch in den Sphäroiden durch die Enkapsulierung der freien Zoledronsäure in die beiden verwendeten Nanovektoren ihr zytotoxisches Potenzial gesteigert werden konnte. Während in PC-3-Homosphäroiden, wie auch in der adhärenz Zellkultur, PLCaPZ NPs die stärkste antiproliferative Wirkung entfalteten, waren in Sphäroiden der beiden anderen Zelllinien LCaPZ NPs der freien Zoledronsäure und PLCaPZ NPs überlegen. Dies markiert einen Unterschied in der Effizienz der jeweiligen Testsubstanz in Abhängigkeit vom verwendeten Zellkultursystem.

Darüber hinaus kann festgehalten werden, dass die einzelnen Substanzen generell im zweidimensionalen Zellkultursystem eine stärkere Wirkung entfalteten als in den dreidimensionalen Sphäroiden. Die schwächste Wirkung wurde hierbei für LNCaP-Homosphäroide beobachtet. Eine Abschwächung der antitumoralen Effizienz von Chemotherapeutika gegen Tumorzellen, wenn diese als Sphäroide kultiviert werden, ist ein häufig beobachtetes und wohl bekanntes Phänomen. (Desoize B et al., 1998; Olive PL et al., 1994; Knuchel R et al., 1989; Wibe E, 1980; Erlichman C et al., 1984; Torisawa Y-S et al., 2005) Die Chemotherapeutikaresistenz von Tumorzellsphäroiden wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören die eingeschränkte Penetrationsfähigkeit der Medikamente, Zell-Zellkontakte und ein sich von außen nach innen veränderndes Microenvironment innerhalb der Sphäroide sowie deren zonaler Aufbau aus Zellschichten, die sich in unterschiedlichen Zellzyklusstadien befinden. (Desoize B et al., 2000; Friedrich J et al., 2009; Kerr DJ et al., 1988; Kunz-Schughart LA, 1999; Kwok TT et al., 1985) Interzelluläre Kontakte können zum Beispiel über die Aktivierung von Signalkaskaden wie PI3K/Akt, NF- κ B und Stat3 das Überleben von Zellen fördern. Zusätzlich führt die Abnahme der Zahl proliferierender Zellen innerhalb der Sphäroide zu einer Abnahme des zytotoxischen Effektes der Chemotherapeutika, die im Wesentlichen selektiv gegen proliferierende Zellen wirken. Über die Bindung von Medikamenten an Komponenten der ECM wird nicht nur ihr Vordringen zu ihren eigentlichen Zielzellen verhindert, sondern gleichzeitig nimmt hierdurch die Anzahl an verfügbaren Molekülen des Medikamentes ab. (Mehta G et al., 2012) Ähnlich wie in Geweben in vivo ist die Penetrationsfähigkeit des Pharmakons ins Innere der Sphäroide der Dosis-limitierende Schritt für dessen antitumorale Wirksamkeit. Angesichts der Tatsache,

dass die Diffusionsstrecke innerhalb von Sphäroiden für die meisten Moleküle 150µm - 200µm beträgt, ist es nicht verwunderlich, dass die schlechteste antitumorale Wirksamkeit der freien Zoledronsäure bzw. ihrer Nanomodifikationen in LNCaP-Sphäroiden beobachtet wurde, da diese im Vergleich zu den beiden anderen verwendeten Prostatakarzinomzelllinien die mit Abstand größten Sphäroide bildeten. Somit war das Vordringen der applizierten Substanzen zum Zentrum der Sphäroide für die Zelllinie LNCaP am schwierigsten, was die im Vergleich zu DU 145- und PC-3-Sphäroiden geringere Hemmung der Zellproliferation erklären würde.

5.2.2 Heterosphäroide

Im Vergleich zu den Homosphäroiden wurde für die Zoledronsäure und ihre beiden Nanomodifikationen in Heterosphäroiden eine weitere Abnahme ihrer zytotoxischen Wirksamkeit beobachtet, wobei die gleichen Modifikationen wie in den Homosphäroiden das größte antitumorale Potenzial besaßen, d.h. in PC-3-Heterosphäroiden PLCaPZ NPs und in DU 145- und LNCaP-Heterosphäroiden LCaPZ NPs. Diese Ergebnisse sind insofern überraschend, da die verwendeten tumorassoziierten PTF 54-Fibroblasten im zweidimensionalen Zellkultursystem auf eine Behandlung mit den einzelnen Testsubstanzen in 5µM Konzentration, welche einem Viertel der in den Heterosphäroiden verwendeten Substanzkonzentrationen entspricht, mit einer drastischen Abnahme ihrer Zellproliferation reagierten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen jedoch dafür, dass im dreidimensionalen Verband mit den Prostatakarzinomzellen die tumorassoziierten Fibroblasten einen protektiven Einfluss auf die Inhibition der Zellproliferation innerhalb der Heterosphäroide durch Inkubation mit den Testsubstanzen ausüben. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Yip et al. bezüglich der antitumoralen Wirksamkeit von Doxorubicin in Heterosphäroiden aus Lebertumorzellen und stromalen Zellen publiziert. Menschliche Zellen des hepatozellulären Karzinoms der Linie HepG2 wurden sowohl als zweidimensionaler Monolayer als auch als Homo- und Heterosphäroide in Kombination mit murinen Fibroblasten der Zelllinie 3T3-J2 kultiviert und mit Doxorubicin in einer Konzentration von 10µM inkubiert. Homo- und Heterosphäroide wurden anschließend zum Teil in Kollagen-Gel enkapsuliert, um - zusätzlich zu der dreidimensionalen Zytoarchitektur und der Existenz unterschiedlicher Zellarten innerhalb des Tumormicroenvironments - Barrieren durch extrazelluläre Matrixkomponenten zu simulieren, welche ebenfalls in vivo vorkommen. In Analogie zu den hier für die Wirkung der unterschiedlichen Formen der Zoledronsäure gegen Prostatakarzinomzellen erhobenen Daten konnte demonstriert werden, dass im Vergleich zur zweidimensionalen Zellkultur die Zellproliferation in HepG2-Zellen durch Doxorubicin

weniger stark gehemmt wird, wenn diese als dreidimensionale Sphäroide kultiviert werden. Dabei waren HepG2-Heterosphäroide wiederum resistenter gegen Doxorubicin als HepG2-Homosphäroide. In Kollagen-Gel enkapsulierte HepG2-Homo- und -Heterosphäroide waren ihrerseits resistenter gegen Doxorubicin als ihre nicht enkapsulierten Äquivalente, wobei zwischen enkapsulierten Homo- und Heterosphäroiden kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegen das Chemotherapeutikum nachgewiesen werden konnte. (Yip D et al., 2013) Mürköster et al. konnten illustrieren, dass durch Cokultur menschlicher Pankreaskarzinomzellen der Linien T3M4 und PT45-P1 mit murinen Pankreasmyofibroblasten bzw. durch Kultur der Pankreaskarzinomzellen in konditioniertem Medium besagter Fibroblasten die Sensitivität der Tumorzellen gegen das Chemotherapeutikum Etoposid abnimmt, sichtbar an einer geringeren Induktion von Apoptose. (Mürköster S et al., 2004) Ähnliche Beobachtungen wurden von Shekhar et al. angestellt. Sie konnten unter Verwendung dreidimensionaler Cokultursysteme zeigen, dass in prämaligen, per se Tamoxifen-sensitiven Mammakarzinomzellen der Linie EIII8 durch aus Estrogen- und Progesteronrezeptor-negativen Mammakarzinomen isolierte tumorassoziierte Fibroblasten eine Tamoxifenresistenz induziert werden kann. (Shekhar MPV et al., 2007) Die zitierten Publikationen sprechen zusammen mit den hier gemachten Beobachtungen dafür, dass die Chemotherapeutikaresistenz von Tumorsphäroiden bzw. Tumorzellen allgemein durch die Zugabe von tumorassoziierten Fibroblasten zu den entsprechenden Tumorepithelzellen gesteigert werden kann.

Ein möglicher Grund für den offensichtlich protektiven Einfluss der Fibroblasten in den Prostatakarzinomheterosphäroiden trotz ihrer eigenen hohen Empfindlichkeit gegenüber den Testsubstanzen könnte ihre räumliche Verteilung innerhalb der Heterosphäroide sein. Da die generierten Heterosphäroide keiner histologischen Untersuchung im Hinblick auf das Verteilungsmuster der miteinander kombinierten Tumorepithelzellen und tumorassoziierten Fibroblasten unterzogen wurden, können diesbezüglich nur Hypothesen geäußert werden. In den von Yip et al. erzeugten Heterosphäroiden wurden die HepG2- und 3T3-J2-Zellen vor der Sphäroidformation mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um ihre Lokalisation innerhalb der dreidimensionalen Zellaggregate bestimmen zu können. Es konnte veranschaulicht werden, dass sich die murinen Fibroblasten hauptsächlich im inneren Kern der Heterosphäroide befanden, während die Leberkarzinomzellen sowohl im Zentrum der Heterosphäroide als auch in deren Peripherie nachgewiesen wurden. (Yip D et al., 2013) Kunz-Schughart publizierte, dass ein Nachteil bei der Herstellung von Heterosphäroiden durch Mischen von Zellsuspensionen unterschiedlicher Zelllinien die Entstehung nicht

reproduzierbarer Cluster unterschiedlicher Größe und Gestalt aus Zellen eines Zelltypes wie zum Beispiel Fibroblasten innerhalb der Sphäroide ist. (Kunz-Schugart LA, 1999) Doch auch bei Verwendung eines anderen dreidimensionalen heterologen Cokultursystems, bei dem initial Homosphäroide aus unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien und Fibroblasten getrennt voneinander generiert und erst nach Sphäroidformation miteinander kombiniert wurden, wurde ein infiltratives Wachstum der Tumorepithelzellen innerhalb der Mammakarzinomsphäroide beobachtet, welches zu einem Umwachsen der Fibroblastsphäroide durch die Mammakarzinomzellen führte. Dabei entstanden ebenfalls Heterosphäroide mit einem zonalen Aufbau, in deren Zentrum sich fast ausschließlich Fibroblasten befanden, während die Tumorzellen in der Peripherie der Sphäroide anzufinden waren. Nur eine der verwendeten Mammakarzinomzelllinien, SK-BR-3, führte zu einer exzessiven Infiltration der zentralen Fibroblastsphäroide. (Kunz-Schughart LA et al., 2001) Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass sich in Heterosphäroiden, die durch Kombination unterschiedlicher Tumorepithelzellen und Fibroblasten generiert wurden, die Fibroblasten im Inneren der Heterosphäroide befanden, unabhängig von der Tumorentität bzw. der Herkunft der Fibroblasten. Nimmt man gleiches für die Prostatakarzinomheterosphäroide an, so wären die tumorassoziierten Prostatakarzinomfibroblasten im Inneren der Sphäroide durch einen Wall äußerer Prostatakarzinomzellen vor dem zytotoxischen Einfluss der Testsubstanzen relativ geschützt. Dadurch wäre ihre Proliferation durch die Testsubstanzen weniger stark kompromittiert, während Wechselwirkungen zwischen den Fibroblasten und den Prostatakarzinomzellen zu der beobachteten gesteigerten Chemotherapeutikaresistenz beitragen könnten.

Über welche biochemischen Mechanismen die tumorassoziierten Fibroblasten zu einer Reduktion der Empfindlichkeit der Heterosphäroide gegenüber den einzelnen Testsubstanzen führen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht analysiert. Das Tumorstroma in vivo ist generell von entscheidender Bedeutung für Entstehung, Progression und Metastasierung von Malignomen, wobei das Ausmaß des Beitrages tumorassoziiierter Fibroblasten zu der Pathogenität eines Tumors noch nicht vollständig verstanden wurde. Folkman konnte zeigen, dass Tumorzellsphäroide nur bis zu einer Größe von wenigen Millimetern in vitro kultiviert werden können, da sie keine Blutversorgung aufweisen. (Folkman J, 1985) Blutgefäße innerhalb des Tumorstromas dienen hierbei nicht nur der Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und der Entfernung von Stoffwechselendprodukten, sondern stellen auch die Eintrittspforte für gestreute Tumorzellen dar. (Rak JW et al., 1995) Darüber hinaus konnte durch die Transplantation von Kolonkarzinomzellen in Granulationsgewebe demonstriert

werden, dass das Tumorstroma die invasiven Eigenschaften von Tumorzellen verstärkt. (Dingemans KP et al., 1993) In diesem Zusammenhang ist das Tumorstroma einerseits durch Bereitstellung (Okada A et al., 1995) sowie Aktivierung (Pyke C et al, 1991; Wernert N et al., 1994) von Matrixmetalloproteinasen (MMP) am Abbau von ECM-Komponenten (Ennis BW et al., 1994) beteiligt. Andererseits werden vom Tumorstroma lösliche Faktoren freigesetzt, welche die Adhärenz von Tumorzellen an ECM reduzieren und die Migrationsfähigkeit von Zellen steigern. (Matsumoto K et al., 1994) Verschiedene Studienergebnisse sprechen dafür, dass die Zellproliferation von Tumorzellen über vier Mechanismen durch das Tumorstroma reguliert werden kann. Zum einen spielen Zell-Matrix-Interaktionen für die Signaltransduktion von Wachstumsstimuli eine wichtige Rolle. So ist zum Beispiel die Antwort von Zellen auf Wachstumsfaktoren von deren Interaktion mit Komponenten der ECM über Integrine abhängig. (Clark EA et al., 1995) Ferner kann die Tumorzellproliferation direkt durch stromale Zellen wie Fibroblasten oder indirekt durch lösliche Faktoren besagter stromaler Zellen moduliert werden. (Wernert N, 1997) Schließlich können ECM-Komponenten wie Heparansulfat als Speicher für Wachstumsfaktoren wie basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) dienen. (Flaumenhaft R et al., 1990)

Hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen tumorassoziierten Fibroblasten und Tumorepithelzellen speziell im Prostatakarzinom konnte von Bruzzese et al. gezeigt werden, dass der growth/differentiation factor 15 (GDF15) sowohl lokale als auch systemische protumorigene Eigenschaften besitzt. (Bruzzese F et al., 2014) GDF15 ist ein Mitglied der BMP-Unterfamilie, welche Teil der TGF β -Superfamilie ist und wird unter physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben außer der Plazenta in niedrigen Konzentrationen vorgefunden und von den meisten Zellen mit Ausnahme von Makrophagen exprimiert (Karan D et al., 2009). Unter anderem im Prostatakarzinom wird GDF15 überexprimiert. (Bauskin AR et al., 2006) Dabei korrelieren hohe Serumspiegel mit Krankheitsprogress, kürzerem Überleben und Rekurrenz der Erkrankung. (Brown DA et al., 2006) Zusätzlich wurde von Huang et al. beobachtet, dass in Gewebe- und Serumproben von Patienten mit lokalisiertem Adenokarzinom der Prostata, die neoadjuvant mit Docetaxel bzw. Mitoxantron behandelt wurden, molekulare Veränderungen nachgewiesen werden können, welche mit der Entwicklung einer Chemotherapeutikaresistenz innerhalb der Prostatakarzinomzellen in Verbindung gebracht wurden. Dabei wurde insbesondere auf die Bedeutung einer gesteigerten Expression von GDF15 als wichtige Komponente der Chemotherapeutikaresistenz der Prostatakarzinomzellen verwiesen. (Huang C-Y et al., 2007) Als weiterer Hinweis darauf, dass GDF15 die Chemotherapeutikaresistenz von Tumorzellen beeinflusst, wurde von Joshi et

al. nachgewiesen, dass GDF15 über eine Phosphorylierung von HER2 die Sensitivität von HER2-überexprimierenden Mammakarzinomzellen gegenüber Trastuzumab reduziert. (Joshi JP et al., 2011) Im Prostatakarzinom können, wie bereits erwähnt, im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe erhöhte GDF15-Spiegel gemessen werden, wobei die Spiegel umso höher sind, je höher der Gleason-Grad ist. Während bereits früher über eine hohe Expression von GDF15 durch Epithelzellen von Tumoren berichtet wurde, gelang es Bruzzese et al. als erstes, mittels in situ Hybridisierung eine gesteigerte Expression von GDF15 auch im Tumorstroma des Prostatakarzinoms, genauer gesagt in tumorassoziierten Fibroblasten, nachzuweisen und somit tumorassoziierte Fibroblasten als wichtige, zuvor unbekannte Quelle für GDF15 zu identifizieren. Als Indiz für die Bereitstellung lokaler bzw. parakriner Signale für den Tumorprogress durch GDF15 konnte demonstriert werden, dass für LNCaP-Zellen bei Cokultur mit Fibroblasten, welche GDF15 überexprimieren, oder bei Inkubation mit konditioniertem Medium besagter Fibroblasten ein gesteigertes Zellwachstum beobachtet wird. Zusätzlich förderten GDF15-überexprimierende Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten die Migration und Invasion von LNCaP-Zellen stärker. Darüber hinaus kam es im Xenograft-Mausmodell durch subkutane Injektion von LNCaP-Zellen zusammen mit GDF15-überexprimierenden Fibroblasten in kürzer Zeit zu einer Tumorformation, wobei sich die gebildeten Tumoren zusätzlich durch ein verbessertes Wachstum auszeichneten, als bei Verwendung von Kontrollfibroblasten ohne gesteigerte GDF15-Expression. Dass GDF15 allerdings nicht nur lokale bzw. parakrine Effekte auf LNCaP-Zellen ausübt, konnte ebenfalls mit Hilfe des Xenograft-Mausmodells bewiesen werden. Dazu wurden in eine Flanke der Nacktmäuse entweder LNCaP-Zellen zusammen mit GDF15-überexprimierenden Fibroblasten oder mit Kontrollfibroblasten injiziert, während in die kontralaterale Flanke nur LNCaP-Zellen als Respondertumore injiziert wurden, welche allein ohne Fibroblasten keine Xenografts bilden können (Augsten M et al., 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Respondertumore durch die Anwesenheit von GDF15-überexprimierenden Fibroblasten in der kontralateralen Flanke drastisch gesteigert werden kann, was zusätzlich für systemische Effekte von GDF15 spricht. (Bruzzese F et al., 2014)

Um die Bedeutung des Ursprungs tumorassoziiierter Fibroblasten für ihre Interaktion mit Krebsstammzellen des CRPC (CRPCSC) zu untersuchen, wurden von Adisetiyo et al. CRPCSC mit tumorassoziierten Fibroblasten kokultiviert, die zum einen aus einem Xenograft-Mausmodell des androgenabhängigen (ADPCAF) und zum anderen aus einem Tiermodell des CRPC isoliert wurden (CRPCAF). Dabei konnte sowohl in vitro als auch in vivo veranschaulicht werden, dass CRPCAF ADPCAF in Bezug auf die Unterstützung von

CRPCSC zur Bildung organähnlicher Strukturen und zur Tumorinitiation überlegen sind. In vitro führte die Kokultur der Krebsstammzellen mit CRPCAF zehnmal häufiger zur Ausbildung von Sphäroiden, wobei die Anzahl von Sphäroiden mit einer Größe über 100µm um das Sechsfache erhöht war als bei Verwendung von ADPCAF. Während im Mausmodell die Kombination mit ADPCAF nur in einem von vier Fällen zur Ausbildung eines Tumors nach Injektion von CRPCSC führte, wurde dies für CRPCAF in allen vier Fällen beobachtet. Die gebildeten Tumore unterschieden sich außerdem hinsichtlich ihrer histologischen Struktur. Während in dem durch Kombination mit ADPCAF entstandenen Tumor nur wenige, gut differenzierte Drüsenstrukturen vorgefunden wurden, wurden nach Coinjektion von CRPCAF nicht nur insgesamt mehr Drüsenstrukturen nachgewiesen, sondern neben gut differenzierten auch weniger gut differenzierte. Die Ausbildung eines aggressiveren Phänotypes konnte selbst durch eine Steigerung der ADPCAF um das Zehnfache nicht erreicht werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass es im Rahmen der Entstehung des CRPC zu einer Coevolution zwischen den Tumorepithelzellen und den tumorassoziierten Fibroblasten kommt, wodurch die Fibroblasten charakteristische Eigenschaften erlangen, die tumorassoziierten Fibroblasten des weniger fortgeschrittenen Krankheitsstadiums fehlen. In diesem Zusammenhang wurde die Sekretion von bestimmten Mitogenen in Erwägung gezogen, welche über einen parakrinen Wirkmechanismus zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen beitragen. (Adisetiyo H et al., 2014)

Für die Coevolution von Prostatakarzinomzellen und tumorassoziierten Fibroblasten im Rahmen des Krankheitsprogresses sprechen auch die Beobachtungen von Giannoni et al.. Sie konnten Wechselwirkungen zwischen tumorassoziierten Fibroblasten und Prostatakarzinomzellen identifizieren, welche zu einer gegenseitigen Aktivierung der Zellen führen. Es wurde nachgewiesen, dass Fibroblasten durch von Prostatakarzinomzellen sezerniertes Interleukin-6 (IL-6) aktiviert werden können und dadurch ihrerseits verstärkt die MMP 2 und MMP 9 sezernieren, welche über den proteolytischen Abbau der dreidimensionalen Matrix innerhalb des Tumormicroenvironments die Fähigkeit der Prostatakarzinomzellen zur Migration über eine Rho-unabhängige Motilitätsinduktion steigern, wodurch letztlich die Invasivität der Prostatakarzinomzellen zunimmt. Dabei wurden zwei interessante Erkenntnisse gewonnen. Erstens wurde dargelegt, dass die Höhe der IL-6-Produktion durch Prostatakarzinomzellen mit deren Aggressivität korreliert. Nur hochmaligne PC-3- und DU 145-Zellen waren in der Lage, ausreichend hohe IL-6-Spiegel zu sezernieren, LNCaP-Zellen hingegen nicht. Zweitens wurde nachgewiesen, dass im Gegensatz zu normalen Prostatafibroblasten und Fibroblasten aus der tumorfreien Region von

Prostatektomien tumorassoziierte Fibroblasten initial nicht in vitro mittels IL-6 stimuliert bzw. aktiviert werden müssen, sondern dass diese ohne vorherige Aktivierung direkt in der Lage sind, die Invasivität von PC-3-Zellen zu steigern. Die gegenseitige Beeinflussung von Fibroblasten und Prostatakarzinomzellen mit konsekutiver Einleitung eines Differenzierungsprozesses wird im Falle der Prostatakarzinomzellen als Epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet. Die Prostatakarzinomzellen erlangen im Zuge der EMT Stammzeleigenschaften, wodurch ihre Aggressivität und ihr Potenzial zu Wachstum, Sphäroidformation und Metastasierung steigen. Für die Fähigkeit der Tumorformation in vivo wurden ähnliche Beobachtungen wie von Bruzzese et al. und Adisetiyo et al. angestellt. Die tumorassoziierten Fibroblasten bzw. zuvor in vitro mit IL-6 aktivierte Fibroblasten führten zu einer häufigeren Tumorbildung mit größerer Wachstumspotenz als die nicht aktivierten Äquivalente. Zusätzlich wurden Lungenmetastasen nur bei Verwendung aktivierter bzw. tumorassoziierter Fibroblasten beobachtet. (Giannoni E et al., 2010)

Tumorstammzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Regeneration aus, weswegen sie eine wichtige Rolle für Chemotherapeutikaresistenz, Rekurrenz sowie - im Falle des Prostatakarzinoms - für die Entwicklung des CRPC spielen. Von Geary et al. konnte hierbei ein weiteres, von tumorassoziierten Fibroblasten sezerniertes Molekül identifiziert werden, das Prostatakarzinomzellen dabei hilft, im Zuge einer EMT Stammzellcharakter zu erreichen. Es handelt sich um Annexin A1 (AnxA1), ein Protein, das an Phospholipide bindet. AnxA1 wird von Prostatakarzinom-assoziierten Fibroblasten signifikant stärker exprimiert als von normalen Prostatafibroblasten. Die höchsten Konzentrationen von AnxA1 im menschlichen Körper wurden im Prostatasekret nachgewiesen. In Analogie zu den Beobachtungen von Adisetiyo et al., Bruzzese et al. und Giannoni et al. führten tumorassoziierte Fibroblasten, welche AnxA1 exprimieren, in vitro häufiger zur Bildung von komplexeren Sphäroiden und in vivo zu Tumoren mit einer größeren Anzahl histologisch komplexerer Drüsenstrukturen als normale Prostatafibroblasten mit geringer AnxA1-Sekretion. AnxA1 führte ferner in Prostatakarzinomzellen nicht nur zu einem Dedifferenzierungsprozess im Zuge der EMT, wodurch die Zellen Stammzeleigenschaften erhielten, sondern stimulierte zusätzlich die Proliferation der entstandenen Prostatakarzinomstammzellen. AnxA1 vermittelte somit auf zwei unterschiedliche Arten Stammzeleigenschaften in Prostatakarzinomzellen. Erstens über die de novo Genese von Prostatakarzinomstammzellen und zweitens über die Aufrechterhaltung dieser Population durch Unterstützung ihrer Zellproliferation. (Geary LA et al., 2014)

Nimmt man auf Grundlage der Ergebnisse von Adisetiyo et al. und Giannoni et al. Wechselwirkungen zwischen Prostatakarzinomzellen und tumorassoziierten Fibroblasten an, die im Krankheitsverlauf zu einer Coevolution der beiden Zelltypen führen, so stellt ein Schwachpunkt der in dieser Arbeit generierten Heterosphäroide die unterschiedliche Herkunft der miteinander kombinierten Zellarten dar. Da die etablierten, permanenten Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP mit tumorassoziierten PTF 54-Fibroblasten kombiniert wurden, die als Primärkultur aus Prostektomiepräparaten isoliert wurden, bestanden vorab zwischen den einzelnen Zellarten keine Wechselwirkungen, die zu einem gemeinsamen Differenzierungsprozess hätten führen können. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass die verwendeten Zelllinien unterschiedlichen Krankheitsstadien entsprechen, da die permanenten Tumorepithelzellen aus Metastasen von Patienten mit fortgeschrittenem, metastasiertem Prostatakarzinom stammen, während die tumorassoziierten Fibroblasten eher dem lokal begrenzten bzw. lokal fortgeschrittenen Krankheitsstadium zuzuordnen sind. Kunz-Schughart et al. konnten für ein heterologes, dreidimensionales Cokulturmodell des Mammakarzinoms zeigen, dass durch die Verwendung normaler bzw. tumorassoziierten Fibroblasten unterschiedlich fortgeschrittene Krankheitsstadien in vitro simuliert werden können. (Kunz-Schughart LA et al., 2001)

Die Bedeutung des Zusammenspiels von Prostatakarzinomzellen und tumorassoziierten Fibroblasten könnte daher repräsentativer mittels eines dreidimensionalen Zellkultursystems erforscht werden, in welchem Primärkulturen tumorassoziierten Fibroblasten mit ihren korrespondierenden Prostatakarzinomepithelzellen kombiniert werden. Die erfolgreiche Etablierung von Primärkulturen des Prostatakarzinoms wird insbesondere durch zwei Phänomene erschwert. Zum einen ist aufgrund der Heterogenität des Prostatakarzinoms die Entnahme einer geeigneten Gewebeprobe schwierig, zumal der Tumor makroskopisch im Präparat häufig nicht sicher identifiziert werden kann. Daher ist es nahezu unmöglich, im Vorfeld zu beurteilen, ob die ausgewählte Probe repräsentativ für den Tumor ist. (Jung V et al., 2008) Zum anderen scheint es in Primärkulturen zu einer schnellen Selektionierung scheinbar normaler Epithelien mit diploidem Chromosomensatz zu kommen, da die in vitro Proben häufig im Gegensatz zum Biopsiematerial genetisch unauffällig sind. (Ketter R et al., 1996) Im urologischen Forschungslabor der Universität des Saarlandes wurde ein dreidimensionales Prostatakarzinomzellkulturmodell entwickelt, mit dessen Hilfe es erstmalig möglich scheint, aus heterogenen Prostatakarzinomen invasive und somit klinisch relevante Zellsubpopulationen als Primärkultur zu isolieren und weiter zu expandieren. Dazu wurden Gewebeproben aus Prostektomiepräparaten entnommen. Je nach verwendetem

Zellkulturmedium wurden Prostatakarzinomzellen bzw. tumorassoziierte Fibroblasten mittels eines bereits etablierten Primärzellkulturmodells isoliert, das zusätzlich mit einem Invasionssystem kombiniert wurde. Nach Selektionierung der invasiv wachsenden Prostatakarzinomzellen wurden diese als dreidimensionale Sphäroide weiterkultiviert, bevor weitere Untersuchungen durchgeführt wurden. (Jung V et al., 2008) Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, neben Primärkulturen von Prostatakarzinom-assoziierten Fibroblasten auch Primärkulturen korrespondierender Tumorepithelzellen aus Gewebestückchen von Prostatektomiepräparaten zu gewinnen. Im Gegensatz zu permanenten Zelllinien bieten Primärkulturen den Vorteil absoluter Patientennähe. Dies wäre vor allem unter dem Gesichtspunkt einer personalisierten Medizin von besonderem Interesse.

5.3 Probleme und Grenzen der Nanotechnologie

Wenngleich die verwendeten Nanomodifikationen der freien Zoledronsäure zu einer Potenzierung ihrer zytotoxischen Effizienz führten, entfalteten sie sowohl in Abhängigkeit von der Zelllinie als auch vom Zellkultursystem eine unterschiedlich starke Wirkung. Während in der adhärennten Zellkultur in allen drei Zelllinien und in PC-3-Homo- und -Heterosphäroiden PLCaPZ NPs das stärkste zytotoxische Potenzial besaßen, waren in DU 145- und LNCaP-Homo- und -Heterosphäroiden LCaPZ NPs effizienter. Somit können für Prostatakarzinompatienten keine pauschalen Aussagen darüber gemacht werden, welche Nanomodifikation die vielversprechendste Aussicht auf den größtmöglichen antitumoralen Effekt bietet. Stattdessen müsste im Sinne einer personalisierten Medizin für jeden Patient maßgeschneidert die bestwirksame Nanomodifikation der freien Zoledronsäure experimentell eruiert werden. Dies wäre theoretisch mit dem von Jung et al. entwickelten dreidimensionalen Prostatakarzinomzellkulturmodell möglich (Jung V et al., 2008), jedoch mit einem immensen Arbeitsaufwand und daher mit sehr hohen Kosten verbunden.

Dem unbestreitbaren Nutzen der Nanotechnologie bei der Entwicklung neuer chemotherapeutischer Therapieansätze stehen eine Reihe von Schwierigkeiten gegenüber, welche für den bisher nur begrenzten Einsatz der Nanotechnologie in der Therapie von Malignomen verantwortlich sind. Zum einen ist die Herstellung von Nanocarriern heute noch mit einem erheblichen Arbeitsaufwand und hohen Kosten verbunden. Probleme stellen zum einen die zuverlässige und reproduzierbare Synthese einheitlicher Nanopartikel geringer Größenschwankung dar. (Zamboni WC et al., 2012) In dieser Hinsicht haben sich Nanomedikamente auf Lipidbasis wie Mizellen oder Liposomen als vielversprechende Nanovektoren erwiesen, da ihr Herstellungsprozess und ihre biologischen Eigenschaften gut

kontrolliert werden können und sie zu moderaten Kosten in großtechnischem Stil herstellbar sind. (Estella-Hermoso de Mendoza A et al., 2009) Weiterhin problematisch ist die Sterilität der Nanomedikamente, welche Voraussetzung für deren intravenöse Applikation ist. Denn üblichen Sterilisationsverfahren wie Hitze und γ -Strahlung halten Nanopartikel mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht stand, eine Sterilfiltration ist ab einer Größe der Nanomedikamente von über 100nm nicht mehr möglich, so dass nur die aufwendige und mit hohen Kosten verbundene Herstellung der Nanopartikel unter sterilen Bedingungen als Option bleibt. Nicht nur die Herstellung sondern auch die Lagerung birgt Potenzial für Komplikationen, bedingt durch die eingeschränkte Haltbarkeit von Nanopartikeln und geringen Kenntnissen bezüglich ihrer Stabilität gegenüber Licht, Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen. (Zamboni WC et al., 2012) Die Möglichkeit, die hier verwendeten Nanomodifikationen der freien Zoledronsäure unmittelbar vor ihrer Applikation selbst herzustellen, löst zwar lagerungsbedingte Stabilitätsprobleme (Marra M et al. 2012), erfordert jedoch vor jeder Medikamentengabe deren technisch aufwendige Synthese unter sterilen Kautelen. Ob dies im klinischen Alltag praktikabel ist, ist fraglich und müsste sich in der Praxis erst unter Beweis stellen.

Ferner bleibt es schwierig, in vitro Aussagen über die Fähigkeit von Nanovektoren, Medikamente in sich zu verpacken und später wieder freizusetzen, zu treffen. Dies erschwert zusammen mit der Tatsache, dass standardisierte Programme zur Überprüfung der Sterilität, Biokompatibilität, Immunreaktivität, Reinheit und physikochemischer Eigenschaften zumeist nicht auf Nanomedikamente angewendet werden können, die Zulassung nanomodifizierter Pharmaka durch zum Beispiel die amerikanische Food and Drug Administration (FDA). (Zamboni WC et al., 2012) Darüber hinaus wurde für nanomodifizierte Medikamente eine weitaus höhere interindividuelle pharmakokinetische Variabilität als für nicht nanomodifizierte Medikamente beobachtet, wobei Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körperfett und Tumore der Leber einen Einfluss haben können. (Zamboni WC, 2005) Trotz des möglichen medizinischen Nutzens der Nanotechnologie bei der Entwicklung neuer Pharmaka oder sonstiger medizinischer Anwendungen sollte nicht vergessen werden, dass die Nanotechnologie auch das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen birgt. Für Kohlenstoff-Nanopartikel konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass diese zur Peroxidation von Lipiden in Hirnzellen von Fischen führen und Entzündungsprozesse im Lungengewebe von Ratten auslösen. (Stern ST et al., 2008) Ein weiteres Beispiel für das potenziell toxische Potenzial von Nanopartikeln stellen Silbernanopartikel dar. Diese werden aufgrund ihrer bekannten antimikrobiellen Eigenschaften in beträchtlichem Ausmaß in der Medizin für

vielfältige Zwecke verwendet. Trotz ihres weitverbreiteten Gebrauches wurden nur verhältnismäßig wenige Studien zur Untersuchung der zytotoxischen Effekte von Silbernanopartikeln durchgeführt. Von Asare et al. wurde gezeigt, dass Silbernanopartikel in menschlichen NT2-Teratokarzinomzellen eine dosisabhängige Induktion von Apoptose und Nekrose sowie eine verminderte Zellproliferation auslösen. Zusätzlich wurden auf genetischer Ebene dosisabhängige Schäden durch Inkubation von NT2-Zellen mit 200nm großen Silbernanopartikeln beobachtet. In besagten Zellen konnten nach Applikation der Nanopartikel DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden. (Asare N et al., 2012) Auch in Leberzellen wurden zytotoxische Effekte durch Silbernanopartikel nachgewiesen. Über eine vermehrte Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies sowie eine Abnahme der Konzentration an reduziertem Glutathion kam es zu Zellschäden durch oxidativen Stress an multiplen Zellorganellen sowie zu DNA-Strangbrüchen und der Peroxidation von lipidhaltigen Membranen. In Folge dessen wurde eine Abnahme der Zellviabilität beobachtet sowie eine Induktion von Apoptose durch Zusammenbrechen des Membranpotenzials der Mitochondrien mit konsekutiver Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung der Caspasen 3 und 9. Silbernanopartikel verursachten hierbei ein schwerere Zytotoxizität als aus Silbernitrat freigesetzte Silberionen. (Piao MJ et al., 2011)

Die genannten Beispiele illustrieren, dass der Einsatz der Nanotechnologie bei der Suche und Synthese neuer Medikamente mit Herausforderungen bezüglich Reproduzierbarkeit und Vorhersagbarkeit der physikalisch-chemischen Eigenschaften der generierten Medikamente verbunden ist, wodurch einerseits deren Zulassung und andererseits Vorhersagen über deren Wirkungen und insbesondere auch Nebenwirkungen erschwert werden. Um die routinemäßige und großtechnische Entwicklung von Nanomedikamenten zu gewährleisten, müssen Lösungen für oben genannte Probleme gefunden werden. Dass dies möglich ist, wird an der seit der Genehmigung des ersten nanomodifizierten Medikamentes durch die FDA im Jahr 1997 zunehmenden Anzahl zugelassener Nanomedikamente deutlich. (Felice B et al., 2014)

5.4 Probleme und Grenzen der Sphäroidtechnologie

Dem Nutzen der Sphäroide für präklinische Studien von Tumoren aufgrund ihrer gewebeähnlichen Eigenschaften stehen mehrere technische Herausforderungen gegenüber, die den Einsatz der Sphäroidtechnologie komplizieren. Im Vergleich zur Monolayerkultur ist es schwieriger, eine große Anzahl uniformer Sphäroide gleicher Zellzahl, Größe und Morphologie zu generieren und somit die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft von

Experimenten zu gewährleisten. Auch die Zellkultur an sich ist aufwendig und risikoreich, da beim Ernten oder Mediumwechsel von Sphäroiden diese leicht beschädigt werden oder verloren gehen können. Zu den gebräuchlichsten Techniken zur Herstellung von Sphäroiden gehört die „hängende Tropfen“-Methode, bei der Tropfen von Zellsuspensionen aufgrund ihrer Oberflächenspannung an Deckeln von Zellkulturgefäßen haften, in denen sich, der Schwerkraft folgend, Sphäroide ausbilden. Diese Methode, mit der relativ einfach Sphäroide gut kontrollierbarer Größe generiert werden können, ist jedoch äußerst arbeitsintensiv, wobei vor allem regelmäßige Medienwechsel extrem zeitaufwendig sind. Ein anderer Ansatz ist die Kultur von Zellen auf nicht adhären Oberflächen, wodurch Zell-Zell-Interaktionen Zell-Matrix-Interaktionen überwiegen und sich spontan Sphäroide ausbilden. Desweiteren wurden für die Synthese von Sphäroiden Zellkultursysteme wie zum Beispiel Spinnerflaschen entwickelt, welche sich spezieller Bioreaktoren bedienen, die einen gravitationsfreien Raum erzeugen und somit die Aggregation der Zellen zu Sphäroiden ermöglichen. Solche Methoden sind zwar für die Massenproduktion und Langzeitkultur von Sphäroiden geeignet, ihre Anwendbarkeit wird jedoch durch die Notwendigkeit für eine spezielle Ausrüstung und die mangelnde Uniformität der erzeugten Sphäroide limitiert. Auf Basis der Mikro- und Nanotechnologie wurden fortgeschrittenere, elaboriertere Techniken zur Sphäroidkultur entwickelt, welche immense Verbesserungen hinsichtlich Durchsatz, Größenkontrolle und Zellzusammensetzung bieten. Die Anwendung vieler dieser ausgeklügelten Zellkultursysteme ist jedoch äußerst anspruchsvoll und erfordert speziell geschultes Fachpersonal. Außerdem sind einige dieser Verfahren nicht für die Langzeitkultur von bzw. die Medikamententestung an Sphäroiden geeignet, bei denen Medienwechsel bzw. Substanzzugaben erforderlich sind. (Mehta G et al., 2012) Eine nutzerfreundliche Möglichkeit Sphäroide basierend auf der „hängenden Tropfen“-Methode zu generieren und über längere Zeit zu kultivieren bietet eine von Tung et al. entwickelte Zellkulturplatte, mit der 384 Sphäroide gleichzeitig gezüchtet werden können, wodurch ein hoher Durchsatz gewährleistet wird. Diese Platte weist an ihrer Oberfläche Öffnungen auf, über die 15µl - 20µl Zellsuspension instilliert werden können, aus denen sich langsam Sphäroide formieren. Ferner sind über die Öffnungen direkte Manipulationen an den Tropfen wie zum Beispiel Medienwechsel möglich. (Tung Y-C et al., 2011) Unglücklicherweise war die erste Generation dieser Platten empfindlich gegenüber mechanischen Erschütterungen und die hängenden Tropfen konnten nicht länger als 14 Tage sicher aufrecht erhalten werden. Daher wurde eine zweite Generation von Zellkulturplatten entwickelt, welche mit Mikro-Ringen optimiert wurde, um die Tropfen zu stabilisieren. Mit Hilfe dieser Platten konnten über die „hängende Tropfen“-Methode Sphäroide über einen

Zeitraum von 22 Tagen sicher kultiviert werden. (Hsiao AY et al., 2012a; Hsiao AY et al., 2012b)

Einer der Hauptgründe dafür, warum sich die Sphäroidtechnologie bislang nicht als Standardmethode für die Erforschung der Wirksamkeit von Medikamenten *in vitro* durchsetzen konnte, stellt die Tatsache dar, dass die meisten kommerziell erhältlichen Zellkulturassays für die Bedürfnisse der 2D-Kultur entwickelt wurden und nicht ohne weiteres im dreidimensionalen System anwendbar sind. Auch wenn einige Assays zum Nachweis von Apoptose, Proliferation und Zytotoxizität an die Bedürfnisse der Sphäroidtechnologie angepasst werden können, bleibt ähnlich wie beim Problem der Penetration des Pharmakons die Frage offen, ob ein Vordringen der Assay-Reagenzien ins Innere der Sphäroide gewährleistet werden kann und die erhaltenen Ergebnisse somit repräsentativ sind bzw. die Wirkung *in vivo* vorhersagen können. Die Penetrationsfähigkeit ist sowohl von den physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Reagenzien als auch von der Zelllinie und Sphäroidgröße abhängig. (Metha G et al., 2012) Für Tumorsphäroide unterschiedlicher Zelllinien konnte gezeigt werden, dass das Vordringen von Medikamenten mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt werden kann. (Bryce NS et al., 2009; Oishi M et al., 2007; Ying X et al., 2010) Da für molekularbiologische Assays wie Western Blot und RT-PCR hohe Zellzahlen pro Testprobe notwendig sind, sind diese an Lysaten von Sphäroiden nur eingeschränkt anwendbar. Erst durch die Entwicklung von mikrofluidischen Varianten des Western Blot Assays wurde die Auswertung von Testproben geringer Zellzahl möglich. (He M et al., 2010; Paguirigan AL et al., 2010; Pan W et al., 2010) Durch die Weiterentwicklung der Durchflusszytometrie (FCM) zur Mikrodurchflusszytometrie (μ FCM) ist es möglich, Proben wesentlich geringerer Zellzahl als üblich zu analysieren, so dass diese Technik auch an Sphäroiden angewandt werden kann. (Wlodkowic D et al., 2011) Mit Hilfe von Reinigungskits für RNA bzw. Kits, die unter Umgehung der Reinigung von RNA direkt zur Synthese von cDNA in Zellen führen, kann die RT-PCR auch an Sphäroiden mit niedriger Zellzahl zur Genexpressionsanalyse verwendet werden. Von Friedrich et al. wurde eruiert, dass die Zellviabilität innerhalb von Kolonkarzinomsphäroiden der Zelllinien HT29 und HCT-116 einer Größe zwischen 650 μ m und 900 μ m mittels saure-Phosphatase-Assay (APH-Assay) zuverlässig und reproduzierbar gemessen werden kann, ohne dass hierzu die Sphäroide in Einzelzellen aufgetrennt werden müssten. (Friedrich J et al., 2007b) Obgleich weiterhin erheblicher Nachholbedarf bei der Entwicklung einfach und in großem Maßstab durchführbarer sowie zuverlässiger Zellkulturassays für die Sphäroidtechnologie besteht, verdeutlichen die vorgestellten Assay-Methoden, dass dies möglich ist. Die Etablierung von

Standardzellkulturassays für die Sphäroidtechnologie würde es ermöglichen, routinemäßig die Wirksamkeit von Medikamenten im Rahmen präklinischer Studien auf Grundlage dieser physiologischeren Plattform zu untersuchen, welche die Verhältnisse in vivo realitätsnäher simulieren kann, als dies in der zweidimensionalen Zellkultur möglich ist.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung der nanomodifizierten Zoledronsäure auf dreidimensionale Prostatakarzinomsphäroide zu untersuchen. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Durch die Enkapsulierung der freien Zoledronsäure in die verwendeten Nanovektoren kann deren zytotoxisches Potenzial gegen Prostatakarzinomzellen sowohl in der adhärenen Zellkultur als auch im dreidimensionalen Zellverband der Sphäroide gesteigert werden. Das Ausmaß dieser Wirkungssteigerung ist hierbei von der Prostatakarzinomzelllinie, dem zugrunde liegenden Zellkultursystem und der applizierten Modifikation der Zoledronsäure abhängig.
2. Als Hauptwirkmechanismus der Testsubstanzen konnte in allen Zelllinien unabhängig vom verwendeten Zellkultursystem eine Inhibition der Zellproliferation eruiert werden. Eine Induktion von Apoptose und in geringerem Ausmaß auch von Nekrose spielte nur in adhärent wachsenden PC-3-Zellen eine untergeordnete Rolle.
3. Ähnlich wie in den permanenten Prostatakarzinomzelllinien führten die freie Zoledronsäure und ihre Nanomodifikationen auch in Primärkulturen tumorassoziierter Prostatakarzinomfibroblasten zu einer drastischen Abnahme der Zellviabilität. Diese konnte in Analogie zu den Prostatakarzinomzellen auf eine potente Inhibition der Zellproliferation zurückgeführt werden. Dabei reagierten die tumorassozierten Fibroblasten wesentlich empfindlicher auf die einzelnen Testsubstanzen als die permanenten Prostatakarzinomzellen.
4. Komponenten des Tumormicroenvironments wie die dreidimensionale Zytoarchitektur innerhalb der Sphäroide bzw. tumorassozierte Fibroblasten im Verbund der Heterosphäroide steigerten die Chemotherapeutikaresistenz der untersuchten Prostatakarzinomsphäroide gegenüber sämtlichen Formen der Zoledronsäure.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Enkapsulierung der Zoledronsäure in sich selbst zusammensetzende Nanopartikel einen vielversprechenden Ansatz darstellt, ihre antitumorale

Effizienz zu steigern. Sphäroide scheinen hierbei geeignet zu sein, diese Wirkungssteigerung in einem physiologischeren Setting zu untersuchen, als dies mittels konventioneller zweidimensionaler Zellkultur möglich ist.

Zur Validierung der Objektivität und Reliabilität der vorgestellten Ergebnisse sollten weitere *in vitro* Studien bezüglich der Wirkung der nanomodifizierten Zoledronsäuren an dreidimensionalen Prostatakarzinomsphäroiden durchgeführt werden. Durch Verwendung von Primärzellkulturen von Prostatakarzinomzellen und korrespondierenden tumorassoziierten Fibroblasten aus Prostatektomiepräparaten könnten hierbei die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Zelltypen und somit das Tumormicroenvironment noch realitätsnaher *in vitro* simuliert werden, als dies im Rahmen dieser Arbeit geschah. Während Daten bezüglich der Wirksamkeit von PLCaPZ NPs im Xenograft-Mausmodell des Prostatakarzinoms existieren, liegen keine Erkenntnisse bezüglich der Wirksamkeit von LCaPZ NPs *in vivo* vor. Aufgrund der gesteigerten Wirksamkeit dieser Nanomodifikation der Zoledronsäure gegenüber PLCaPZ NPs in DU 145- und LNCaP-Homo- und –Heterosphäroiden sollten *in vivo* Studien durchgeführt werden, die die Effizienz der genannten Nanovektoren miteinander vergleichen. Zukünftige Studien sollten darüber hinaus vor allem den Einfluss der hier verwendeten Nanomodifikationen auf das Nebenwirkungsprofil der Zoledronsäure analysieren. Dabei sollten neben Fragen der allgemeinen Zytotoxizität insbesondere die Auswirkungen der Einkapsulierung der freien Zoledronsäure auf deren Nephrotoxizität und die Entstehung von Kieferosteonekrosen im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses stehen. Die Erkenntnisse, die im Zuge derartiger weiterführender Untersuchungen gewonnen werden würden, könnten langfristig dazu führen, neue Therapieoptionen für Patienten mit CRPC zu etablieren und somit zur Verbesserung der Prognose dieser Patientengruppe beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Acker H, Carlsson J, Holtermann G, Nederman T, Nylén T (1987) Influence of glucose and buffer capacity in the culture medium on growth and pH in spheroids of human thyroid carcinoma and human glioma origin. *Cancer Research* 47:3504–3508
2. Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM (1987) Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *British Journal Of Cancer* 56:325–327
3. Adisetiyo H, Liang M, Liao C-P, Jeong JH, Cohen MB, Roy-Burman P, Frenkel B (2014) Dependence of castration-resistant prostate cancer (CRPC) stem cells on CRPC-associated fibroblasts. *Journal Of Cellular Physiology* 229:1170–1176
4. Adjakly M, Ngollo M, Dagdemir A, Judes G, Pajon A, Karsli-Ceppioglu S, Penault-Llorca F, Boiteux J-P, Bignon Y-J, Guy L, Bernard-Gallon D (2015) Prostate cancer: The main risk and protective factors-Epigenetic modifications. *Annales D'endocrinologie* 76:25–41
5. Allen TM, Hansen C, Rutledge J (1989) Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochimica Et Biophysica Acta* 981:27–35
6. Almubarak H, Jones A, Chaisuparat R, Zhang M, Meiller TF, Scheper MA (2011) Zoledronic acid directly suppresses cell proliferation and induces apoptosis in highly tumorigenic prostate and breast cancers. *Journal Of Carcinogenesis* 10:2–2
7. Andre F, Berrada N, Desmedt C (2010) Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Current Opinion In Oncology* 22:547–551
8. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Gelmann EP, Kvale PA, Reding DJ, Weissfeld JL, Yokochi LA, O'Brien B, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hayes RB, Kramer BS, Izmirlian G, Miller AB, Pinsky PF, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD (2009) Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *The New England Journal Of Medicine* 360:1310–1319
9. Ang JE, Olmos D, de Bono JS (2009) CYP17 blockade by abiraterone: further evidence

- for frequent continued hormone-dependence in castration-resistant prostate cancer. *British Journal Of Cancer* 100:671–675
10. Antonarakis ES, Armstrong AJ (2011) Evolving standards in the treatment of docetaxel-refractory castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer And Prostatic Diseases* 14:192–205
 11. Asare N, Instanes C, Sandberg WJ, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, Brunborg G (2012) Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 291:65–72
 12. Augsten M, Hägglöf C, Olsson E, Stolz C, Tsagozis P, Levchenko T, Frederick MJ, Borg A, Micke P, Egevad L, Ostman A (2009) CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 106:3414–3419
 13. Auriola S, Frith J, Rogers MJ, Koivuniemi A, Mönkkönen J (1997) Identification of adenine nucleotide-containing metabolites of bisphosphonate drugs using ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal Of Chromatography B, Biomedical Sciences And Applications* 704:187–195
 14. Aus G, Abbou CC, Bolla M, Heidenreich A, Schmid H-P, van Poppel H, Wolff J, Zattoni F (2005) EAU guidelines on prostate cancer. *European Urology* 48:546–551
 15. Aydın H, Kızılgöz V, Tekin BO (2015) Overview of current multiparametric magnetic resonance imaging approach in the diagnosis and staging of prostate cancer. *The Kaohsiung Journal Of Medical Sciences* 31:167–178
 16. Barclay WW, Woodruff RD, Hall MC, Cramer SD (2005) A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Endocrinology* 146:13–18
 17. Basso FG, Pansani TN, de Oliveira CF, Turrioni APS, Soares DG, Hebling J, Costa CA de S (2013) Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Brazilian Dental Journal* 24:551–558
 18. Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, Breit SN (2006)

- Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Research* 66:4983–4986
19. Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M (1995) Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 84:493–498
 20. Beer TM, Tombal B (2014) Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England Journal Of Medicine* 371:1755–1756
 21. Benford HL, Frith JC, Auriola S, Mönkkönen J, Rogers MJ (1999) Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Molecular Pharmacology* 56:131–140
 22. De Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB Jr, Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Fléchon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI (2011) Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *The New England Journal Of Medicine* 364:1995–2005
 23. Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G (2008) Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncology* 44:857–869
 24. Border WA, Noble NA (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England Journal Of Medicine* 331:1286–1292
 25. Brown DA, Stephan C, Ward RL, Law M, Hunter M, Bauskin AR, Amin J, Jung K, Diamandis EP, Hampton GM, Russell PJ, Giles GG, Breit SN (2006) Measurement of serum levels of macrophage inhibitory cytokine 1 combined with prostate-specific antigen improves prostate cancer diagnosis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 12:89–96
 26. Brown JE, Neville-Webbe H, Coleman RE (2004) The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocrine-Related Cancer* 11:207–224

27. Bruzzese F, Hägglöf C, Leone A, Sjöberg E, Roca MS, Kiflemariam S, Sjöblom T, Hammarsten P, Egevad L, Bergh A, Ostman A, Budillon A, Augsten M (2014) Local and systemic protumorigenic effects of cancer-associated fibroblast-derived GDF15. *Cancer Research* 74:3408–3417
28. Bryce NS, Zhang JZ, Whan RM, Yamamoto N, Hambley TW (2009) Accumulation of an anthraquinone and its platinum complexes in cancer cell spheroids: the effect of charge on drug distribution in solid tumour models. *Chemical Communications (Cambridge, England)* 2673–2675
29. Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR, Hong SJ, Zhau HE, von Eschenbach AC, Chung LW (1990) Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 87:75–79
30. Caraglia M, Marra M, Naviglio S, Botti G, Addeo R, Abbruzzese A (2010) Zoledronic acid: an unending tale for an antiresorptive agent. *Expert Opinion On Pharmacotherapy* 11:141–154
31. Caraglia M, Luongo L, Salzano G, Zappavigna S, Marra M, Guida F, Lusa S, Giordano C, De Novellis V, Rossi F, Abbruzzese Saccardi A, De Rosa G, Maione S (2013) Stealth liposomes encapsulating zoledronic acid: a new opportunity to treat neuropathic pain. *Molecular Pharmaceutics* 10:1111–1118
32. Carlsson J, Acker H (1988) Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *International Journal Of Cancer Journal International Du Cancer* 42:715–720
33. De Carvalho TM, Heijnsdijk EAM, de Koning HJ (2015) Screening for prostate cancer in the US? Reduce the harms and keep the benefit. *International Journal Of Cancer Journal International Du Cancer* 136:1600–1607
34. Cathomas R (2011) [Prostate Cancer: a Changing Disease.]. *Praxis* 100:91–97
35. Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S, LoRusso P, Ma P, Ravera C, Deckert F, Schran H, Seaman J, Skerjanec A (2002) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *Journal Of Clinical Pharmacology* 42:1228–1236

36. Choi CHJ, Alabi CA, Webster P, Davis ME (2010) Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 107:1235–1240
37. Clark EA, Brugge JS (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science (New York, NY)* 268:233–239
38. Clézardin P (2005) Anti-tumour activity of zoledronic acid. *Cancer Treatment Reviews* 31 Suppl 3:1–8
39. Clézardin P, Ebetino FH, Fournier PGJ (2005) Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Research* 65:4971–4974
40. Clézardin P (2011) Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 48:71–79
41. Corey E, Brown LG, Quinn JE, Poot M, Roudier MP, Higano CS, Vessella RL (2003) Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 9:295–306
42. Corn PG (2012) The tumor microenvironment in prostate cancer: elucidating molecular pathways for therapy development. *Cancer Management And Research* 4:183–193
43. Coxon JP, Oades GM, Kirby RS, Colston KW (2004) Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU International* 94:164–170
44. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z, Eeles RA, Ford LG, Hamdy FC, Holmberg L, Ilic D, Key TJ, La Vecchia C, Lilja H, Marberger M, Meyskens FL, Minasian LM, Parker C, Parnes HL, Perner S, Rittenhouse H, Schalken J, Schmid H-P, Schmitz-Dräger BJ, Schröder FH, Stenzl A, Tombal B, Wilt TJ, Wolk A (2014) Prevention and early detection of prostate cancer. *The Lancet Oncology* 15:e484–e492
45. Denoyelle C, Hong L, Vannier J-P, Soria J, Soria C (2003) New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *British Journal Of Cancer* 88:1631–1640

46. Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC (1998) Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Research* 18:4147–4158
47. Desoize B, Jardillier J (2000) Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Critical Reviews In Oncology/Hematology* 36:193–207
48. Devalapally H, Chakilam A, Amiji MM (2007) Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 96:2547–2565
49. Dingemans KP, Zeeman-Boeschoten IM, Keep RF, Das PK (1993) Transplantation of colon carcinoma into granulation tissue induces an invasive morphotype. *International Journal Of Cancer Journal International Du Cancer* 54:1010–1016
50. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D (1999) Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews* 51:691–743
51. Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J (2011) Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience* 31:10819–10828
52. Efsthathiou E, Logothetis CJ (2010) A new therapy paradigm for prostate cancer founded on clinical observations. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 16:1100–1107
53. Ennis BW, Matrisian LM (1994) Matrix degrading metalloproteinases. *Journal Of Neuro-Oncology* 18:105–109
54. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American Journal Of Surgical Pathology* 29:1228–1242
55. Erlichman C, Vidgen D (1984) Cytotoxicity of adriamycin in MGH-U1 cells grown as monolayer cultures, spheroids, and xenografts in immune-deprived mice. *Cancer Research* 44:5369–5375

56. Estella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ (2009) Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. *Journal Of Biomedical Nanotechnology* 5:323–343
57. Farokhzad OC, Langer R (2009) Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 3:16–20
58. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S (2014) Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science & Engineering C, Materials For Biological Applications* 41:178–195
59. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends In Biotechnology* 31:108–115
60. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, Jiang Q, Tadros S, Dansey R, Goessl C (2011) Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet (London, England)* 377:813–822
61. Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, Staffurth JN, North S, Vogelzang NJ, Saad F, Mainwaring P, Harland S, Goodman OB Jr, Sternberg CN, Li JH, Kheoh T, Haqq CM, de Bono JS (2012) Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Oncology* 13:983–992
62. Flaumenhaft R, Moscatelli D, Rifkin DB (1990) Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *The Journal Of Cell Biology* 111:1651–1659
63. Fleisch H (2002) Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Research: BCR* 4:30–34
64. Folkman J (1985) Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. *Perspectives In Biology And Medicine* 29:10–36
65. Forbat L, Place M, Kelly D, Hubbard G, Boyd K, Howie K, Leung HY (2013) A cohort

- study reporting clinical risk factors and individual risk perceptions of prostate cancer: implications for PSA testing. *BJU International* 111:389–395
66. Fournier PGJ, Daubiné F, Lundy MW, Rogers MJ, Ebetino FH, Clézardin P (2008) Lowering bone mineral affinity of bisphosphonates as a therapeutic strategy to optimize skeletal tumor growth inhibition in vivo. *Cancer Research* 68:8945–8953
 67. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007) Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *International Journal Of Radiation Biology* 83:849–871
 68. Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007) A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *Journal Of Biomolecular Screening* 12:925–937
 69. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols* 4:309–324
 70. Gabizon A, Papahadjopoulos D (1988) Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 85:6949–6953
 71. Gann PH (2002) Risk factors for prostate cancer. *Reviews In Urology* 4 Suppl 5:3–10
 72. Gao Z, Zhang L, Sun Y (2012) Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. *Journal Of Controlled Release: Official Journal Of The Controlled Release Society* 162:45–55
 73. Geary LA, Nash KA, Adisetiyo H, Liang M, Liao C-P, Jeong JH, Zandi E, Roy-Burman P (2014) CAF-secreted annexin A1 induces prostate cancer cells to gain stem cell-like features. *Molecular Cancer Research: MCR* 12:607–621
 74. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P (2010) Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Research* 70:6945–6956
 75. Giger EV, Castagner B, Leroux J-C (2013) Biomedical applications of

- bisphosphonates. *Journal Of Controlled Release: Official Journal Of The Controlled Release Society* 167:175–188
76. Green J, Clézardin P (2010) The molecular basis of bisphosphonate activity: a preclinical perspective. *Seminars In Oncology* 37 Suppl 1:3–11
 77. Green JR, Clézardin P (2002) Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. *American Journal Of Clinical Oncology* 25:3–9
 78. Gressner AM, Polzar B, Lahme B, Mannherz HG (1996) Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor beta. *Hepatology (Baltimore, Md)* 23:571–581
 79. Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC (2008) Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 105:2586–2591
 80. Guzel E, Karatas OF, Semercioz A, Ekici S, Aykan S, Yentur S, Creighton CJ, Ittmann M, Ozen M (2015) Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. *International Journal Of Cancer Journal International Du Cancer* 136:875–879
 81. Haas GP, Sakr WA (1997) Epidemiology of prostate cancer. *CA: A Cancer Journal For Clinicians* 47:273–287
 82. Hains BC, Waxman SG (2006) Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience* 26:4308–4317
 83. Hamilton E, Clay TM, Blackwell KL (2011) New perspectives on zoledronic acid in breast cancer: potential augmentation of anticancer immune response. *Cancer Investigation* 29:533–541
 84. Härmä V, Virtanen J, Mäkelä R, Happonen A, Mpindi J-P, Knuuttila M, Kohonen P, Lötjönen J, Kallioniemi O, Nees M (2010) A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *Plos One* 5:e10431–e10431

85. Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J, Mason MD (2007) Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology* 8:411–419
86. Hautmann R, Petriconi R de (2010) *Urologie: mit 143 Tabellen*, 4., überarb. und aktualisierte Aufl. Springer Medizin, Heidelberg
87. Hayashi N, Cunha GR (1991) Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the Dunning prostatic adenocarcinoma. *Cancer Research* 51:4924–4930
88. Hefermehl L, Elke B, Sulser T (2010) [Prostate cancer]. *Praxis* 99:149
89. Heidenreich A (2003) Bisphosphonates in the management of metastatic prostate cancer. *Oncology* 65 Suppl 1:5–11
90. Helpap B, Egevad L (2007) Die Wertigkeit des 2005 modifizierten Gleason-Gradings in der urologischen Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Der Urologe* 46:59–62
91. He M, Herr AE (2010) Automated microfluidic protein immunoblotting. *Nature Protocols* 5:1844–1856
92. Hirbe AC, Roelofs AJ, Floyd DH, Deng H, Becker SN, Lanigan LG, Apicelli AJ, Xu Z, Prior JL, Eagleton MC, Piwnica-Worms D, Rogers MJ, Weilbaecher K (2009) The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone* 44:908–916
93. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal Of Biotechnology* 148:3–15
94. Hsiao AY, Tung Y-C, Kuo C-H, Mosadegh B, Bedenis R, Pienta KJ, Takayama S (2012) Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates. *Biomedical Microdevices* 14:313–323
95. Hsiao AY, Tung Y-C, Qu X, Patel LR, Pienta KJ, Takayama S (2012) 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnology And Bioengineering* 109:1293–1304

96. Huang C-Y, Beer TM, Higano CS, True LD, Vessella R, Lange PH, Garzotto M, Nelson PS (2007) Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 13:5825–5833
97. Janovská Z (2012) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. A severe side effect of bisphosphonate therapy. *Acta Medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové* 55:111–115
98. Jedinak A, Curatolo A, Zurakowski D, Dillon S, Bhasin MK, Libermann TA, Roy R, Sachdev M, Loughlin KR, Moses MA (2015) Novel non-invasive biomarkers that distinguish between benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *BMC Cancer* 15:259–259
99. Joshi JP, Brown NE, Griner SE, Nahta R (2011) Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 82:1090–1099
100. Joshua AM, Shore ND, Saad F, Chi KN, Olsson CA, Emmenegger U, Scholz M, Berry W, Mukherjee SD, Winkquist E, Haas NB, Foley MA, Dmuchowski C, Perabo F, Hirmand M, Hasabou N, Rathkopf D (2015) Safety of enzalutamide in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer previously treated with docetaxel: expanded access in North America. *The Prostate* 75:836–844
101. Jung V, Saar M, Grobholz R, Stöckle M, Unteregger G, Kamradt J (2008) [Development of a three-dimensional primary prostate cancer cell culture model]. *Der Urologe Ausg A* 47:1199–1204
102. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Krieghoff-Henning E, Kunz B, Penzkofer A, Treml K, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U, Stang A (2013) Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010. Robert Koch-Institut, Berlin
103. Karan D, Holzbeierlein J, Thrasher JB (2009) Macrophage inhibitory cytokine-1:

- possible bridge molecule of inflammation and prostate cancer. *Cancer Research* 69:2–5
104. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC (2013) Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* 32:5501–5511
 105. Kerr DJ, Wheldon TE, Hydns S, Kaye SB (1988) Cytotoxic drug penetration studies in multicellular tumour spheroids. *Xenobiotica; The Fate Of Foreign Compounds In Biological Systems* 18:641–648
 106. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal Of Cancer* 26:239–257
 107. Ketter R, Zwergel T, Romanakis K, Unteregger G, Ziegler M, Zang KD, Wullich B (1996) Selection toward diploid cells in prostatic carcinoma derived cell cultures. *The Prostate* 28:364–371
 108. Kheirandish P, Chinegwundoh F (2011) Ethnic differences in prostate cancer. *British Journal Of Cancer* 105:481–485
 109. Knuchel R, Hofstadter F, Jenkins WE, Masters JR (1989) Sensitivities of monolayers and spheroids of the human bladder cancer cell line MGH-U1 to the drugs used for intravesical chemotherapy. *Cancer Research* 49:1397–1401
 110. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer* 5:726–734
 111. Kostarelos K, Emfietzoglou D, Papakostas A, Yang W-H, Ballangrud AM, Sgouros G (2005) Engineering lipid vesicles of enhanced intratumoral transport capabilities: correlating liposome characteristics with penetration into human prostate tumor spheroids. *Journal Of Liposome Research* 15:15–27
 112. Kotb S, Mosharafa A, Essawi M, Hassan H, Meshref A, Morsy A (2014) Circulating miRNAs 21 and 221 as biomarkers for early diagnosis of prostate cancer. *Tumour Biology: The Journal Of The International Society For Oncodevelopmental Biology And Medicine* 35:12613–12617
 113. Kraywinkel K, Bertz J, Laudi A, Wolf U (2012) Epidemiologie und Früherkennung

häufiger Krebserkrankungen in Deutschland. Hrsg. Robert Koch-Institut Berlin, GBE kompakt 3:

114. Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998) Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *International Journal Of Experimental Pathology* 79:1–23
115. Kunz-Schughart LA (1999) Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biology International* 23:157–161
116. Kunz-Schughart LA, Heyder P, Schroeder J, Knuechel R (2001) A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. *Experimental Cell Research* 266:74–86
117. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R (2004) The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal Of Biomolecular Screening* 9:273–285
118. Kwok TT, Twentyman PR (1985) The relationship between tumour geometry and the response of tumour cells to cytotoxic drugs--an in vitro study using EMT6 multicellular spheroids. *International Journal Of Cancer Journal International Du Cancer* 35:675–682
119. Laginha K, Mumbengegwi D, Allen T (2005) Liposomes targeted via two different antibodies: assay, B-cell binding and cytotoxicity. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1711:25–32
120. Lee MV, Fong EM, Singer FR, Guenette RS (2001) Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Research* 61:2602–2608
121. Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo KV, Mönkkönen J, Rogers MJ, Azhayev A, Väänänen HK, Hassinen IE (2002) Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Molecular Pharmacology* 61:1255–1262
122. Leyten GHJM, Hessels D, Smit FP, Jannink SA, de Jong H, Melchers WJG, Cornel EB, de Reijke TM, Vergunst H, Kil P, Knipscheer BC, Hulsbergen-van de Kaa CA, Mulders PFA, van Oort IM, Schalken JA (2015) Identification of a Candidate Gene

- Panel for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 21:3061–3070
123. Lilja H (1993) Structure, function, and regulation of the enzyme activity of prostate-specific antigen. *World Journal Of Urology* 11:188–191
 124. Lindl T, Gstraunthaler G (2008) *Zell- und Gewebekultur: von den Grundlagen zur Laborbank*, 6. Aufl. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg
 125. Lin J-F, Lin Y-C, Lin Y-H, Tsai T-F, Chou K-Y, Chen H-E, Hwang TI-S (2011) Zoledronic acid induces autophagic cell death in human prostate cancer cells. *The Journal Of Urology* 185:1490–1496
 126. Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, Henry DH, Brown JE, Yardley DA, Richardson GE, Siena S, Maroto P, Clemens M, Bilynskyy B, Charu V, Beuzeboc P, Rader M, Viniegra M, Saad F, Ke C, Braun A, Jun S (2012) Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials. *European Journal Of Cancer (Oxford, England: 1990)* 48:3082–3092
 127. Lobato JV, Maurício AC, Rodrigues JM, Cavaleiro MV, Cortez PP, Xavier L, Botelho C, Hussain NS, Santos JD (2008) Jaw avascular osteonecrosis after treatment of multiple myeloma with zoledronate. *Journal Of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS* 61:99–106
 128. Loblaw DA, Virgo KS, Nam R, Somerfield MR, Ben-Josef E, Mendelson DS, Middleton R, Sharp SA, Smith TJ, Talcott J, Taplin M, Vogelzang NJ, Wade JL 3rd, Bennett CL, Scher HI (2007) Initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer: 2006 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology* 25:1596–1605
 129. Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, Choong PF (2001) Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *British Journal Of Cancer* 84:951–958
 130. Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G (2010) Autophagy regulation by p53. *Current Opinion in Cell Biology* 22:181–185

131. Marra M, Santini D, Meo G, Vincenzi B, Zappavigna S, Baldi A, Rosolowski M, Tonini G, Loeffler M, Lupu R, Addeo SR, Abbruzzese A, Budillon A, Caraglia M (2009) Cyr61 downmodulation potentiates the anticancer effects of zoledronic acid in androgen-independent prostate cancer cells. *International Journal Of Cancer Journal International Du Cancer* 125:2004–2013
132. Marra M, Salzano G, Leonetti C, Tassone P, Scarsella M, Zappavigna S, Calimeri T, Franco R, Liguori G, Cigliana G, Ascani R, La Rotonda MI, Abbruzzese A, Tagliaferri P, Caraglia M, De Rosa G (2011) Nanotechnologies to use bisphosphonates as potent anticancer agents: the effects of zoledronic acid encapsulated into liposomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, And Medicine* 7:955–964
133. Marra M, Salzano G, Leonetti C, Porru M, Franco R, Zappavigna S, Liguori G, Botti G, Chieffi P, Lamberti M, Vitale G, Abbruzzese A, La Rotonda MI, De Rosa G, Caraglia M (2012) New self-assembly nanoparticles and stealth liposomes for the delivery of zoledronic acid: a comparative study. *Biotechnology Advances* 30:302–309
134. Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, Kramer RH (1994) Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 269:31807–31813
135. Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research* 46:6387–6392
136. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, Hanley DA, Kendler DL, Yuen CK, Lewiecki EM (2013) Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *The American Journal Of Medicine* 126:13–20
137. McLeod NMH, Moutasim KA, Brennan PA, Thomas G, Jenei V (2014) In vitro effect of bisphosphonates on oral keratinocytes and fibroblasts. *Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery: Official Journal Of The American Association Of Oral And Maxillofacial Surgeons* 72:503–509
138. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S (2012) Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy.

- Journal Of Controlled Release: Official Journal Of The Controlled Release Society
164:192–204
139. Meikle AW, Smith JA, West DW (1985) Familial factors affecting prostatic cancer risk and plasma sex-steroid levels. *The Prostate* 6:121–128
 140. Micke P, Ostman A (2004) Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 45 Suppl 2:163–175
 141. Milane L, Ganesh S, Shah S, Duan Z-F, Amiji M (2011) Multi-modal strategies for overcoming tumor drug resistance: hypoxia, the Warburg effect, stem cells, and multifunctional nanotechnology. *Journal Of Controlled Release: Official Journal Of The Controlled Release Society* 155:237–247
 142. Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, Mönkkönen J (2006) A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *British Journal Of Pharmacology* 147:437–445
 143. Montague R, Hart CA, George NJ, Ramani VAC, Brown MD, Clarke NW (2004) Differential inhibition of invasion and proliferation by bisphosphonates: anti-metastatic potential of Zoledronic acid in prostate cancer. *European Urology* 46:389–401
 144. Morgan C, Lewis PD, Jones RM, Bertelli G, Thomas GA, Leonard RCF (2007) The in vitro anti-tumour activity of zoledronic acid and docetaxel at clinically achievable concentrations in prostate cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 46:669–677
 145. Morote J, Ramirez C, Gómez E, Planas J, Raventós CX, de Torres IM, Catalán R (2009) The relationship between total and free serum testosterone and the risk of prostate cancer and tumour aggressiveness. *BJU International* 104:486–489
 146. Mostaghel EA, Page ST, Lin DW, Fazli L, Coleman IM, True LD, Knudsen B, Hess DL, Nelson CC, Matsumoto AM, Bremner WJ, Gleave ME, Nelson PS (2007) Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research* 67:5033–5041

147. Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse M-L, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H (2004) Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Research* 64:1331–1337
148. Mundy GR (2002) Bisphosphonates and tumor burden. *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology* 20:3191–3192
149. Niraula S, Le LW, Tannock IF (2013) Treatment of prostate cancer with intermittent versus continuous androgen deprivation: a systematic review of randomized trials. *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology* 31:2029–2036
150. Oades GM, Senaratne SG, Clarke IA, Kirby RS, Colston KW (2003) Nitrogen Containing Bisphosphonates Induce Apoptosis and Inhibit the Mevalonate Pathway, Impairing Ras Membrane Localization in Prostate Cancer Cells. *The Journal of Urology* 170:246–252
151. Oishi M, Nagasaki Y, Nishiyama N, Itaka K, Takagi M, Shimamoto A, Furuichi Y, Kataoka K (2007) Enhanced growth inhibition of hepatic multicellular tumor spheroids by lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate formulated in PEGylated polyplexes. *Chemmedchem* 2:1290–1297
152. Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset P (1995) Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 92:2730–2734
153. Olive PL, Durand RE (1994) Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Reviews* 13:121–138
154. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research* 59:5002–5011
155. Paget S (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Reviews* 8:98–101

156. Paguirigan AL, Puccinelli JP, Su X, Beebe DJ (2010) Expanding the available assays: adapting and validating In-Cell Westerns in microfluidic devices for cell-based assays. *Assay And Drug Development Technologies* 8:591–601
157. Pan W, Chen W, Jiang X (2010) Microfluidic Western blot. *Analytical Chemistry* 82:3974–3976
158. Paparella S, Finkelberg E, Varisco D, Tondelli E, Rocco F (2011) [Use of zoledronic acid in patients with prostate cancer bone metastases: control of pain and musculoskeletal complications]. *Urologia* 78:300–304
159. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, Casey G, Witte JS (1999) Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication Of The American Association For Cancer Research, Cosponsored By The American Society Of Preventive Oncology* 8:901–905
160. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW (2011) Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* 201:92–100
161. Picard O, Rolland Y, Poupon MF (1986) Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice: implication for implantation of metastases. *Cancer Research* 46:3290–3294
162. Pienta KJ, Bradley D (2006) Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 12:1665–1671
163. Pons-Anicet D, Ramaioli A, Namer M, Krebs BP (1988) Evaluation of prostate-specific antigen in prostate cancer. *American Journal Of Clinical Oncology* 11 Suppl 2:71–74
164. Porru M, Zappavigna S, Salzano G, Luce A, Stoppacciaro A, Balestrieri ML, Artuso S, Lusa S, De Rosa G, Leonetti C, Caraglia M (2014) Medical treatment of orthotopic glioblastoma with transferrin-conjugated nanoparticles encapsulating zoledronic acid. *Oncotarget* 5:10446–10459

165. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *The American Journal Of Physiology* 277:C1–C9
166. Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grøndahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Danø K (1991) Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *The American Journal Of Pathology* 138:1059–1067
167. Rak JW, St Croix BD, Kerbel RS (1995) Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 6:3–18
168. Ramadan WH, Kabbara WK, Al Basiouni Al Masri HS (2015) Enzalutamide for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncotargets And Therapy* 8:871–876
169. Riebeling C, Forsea A-M, Raisova M, Orfanos CE, Geilen CC (2002) The bisphosphonate pamidronate induces apoptosis in human melanoma cells in vitro. *British Journal Of Cancer* 87:366–371
170. Roelofs AJ, Jauhiainen M, Mönkkönen H, Rogers MJ, Mönkkönen J, Thompson K (2009) Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *British Journal Of Haematology* 144:245–250
171. Rogers MJ (2004) From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcified Tissue International* 75:451–461
172. Romero FR, Romero AW, Almeida RMS de, Oliveira FC de Jr, Tambara Filho R (2012) The significance of biological, environmental, and social risk factors for prostate cancer in a cohort study in Brazil. *International Braz J Urol: Official Journal Of The Brazilian Society Of Urology* 38:769–778
173. Rosenfeldt MT, Ryan KM (2009) The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. *Expert Reviews In Molecular Medicine* 11:e36–e36
174. Rosser CJ (2008) Prostate cancer--to screen, or not to screen, is that the question? *BMC*

Urology 8:20–20

175. Röthke MC, Afshar-Oromieh A, Schlemmer H-P (2013) [Potential of PET/MRI for diagnosis of prostate cancer]. *Der Radiologe* 53:676–681
176. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Zheng M (2004) Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Journal Of The National Cancer Institute* 96:879–882
177. Salzano G, Marra M, Porru M, Zappavigna S, Abbruzzese A, La Rotonda MI, Leonetti C, Caraglia M, De Rosa G (2011) Self-assembly nanoparticles for the delivery of bisphosphonates into tumors. *International Journal Of Pharmaceutics* 403:292–297
178. Sängler S, Wiegel T, Stöckle M, Härter M, Bergelt C (2015) Entwicklung von Aufklärungsmaterialien für die „Deutsche Prostatakrebsstudie PREFERE“. *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen* 109:28–39
179. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, Gavasci M, Rocci L, Tirindelli MC, Altomare V, Tocchini M, Bonsignori M, Tonini G (2003) Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 9:2893–2897
180. Santini D, Vincenzi B, Galluzzo S, Battistoni F, Rocci L, Venditti O, Schiavon G, Angeletti S, Uzzalli F, Caraglia M, Dicuonzo G, Tonini G (2007) Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 13:4482–4486
181. Schaefer C, Weissbach L (2012) [The results of the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC) 2012: confirmation or disappointment?]. *Der Urologe Ausg A* 51:1751–1753
182. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF (2009) Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *British Journal Of Haematology* 144:667–676

183. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Määttänen L, Lilja H, Denis LJ, Recker F, Paez A, Bangma CH, Carlsson S, Puliti D, Villers A, Rebillard X, Hakama M, Stenman U-H, Kujala P, Taari K, Aus G, Huber A, van der Kwast TH, van Schaik RHN, de Koning HJ, Moss SM, Auvinen A (2014) Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* (London, England) 384:2027–2035
184. Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW (2000) Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *British Journal Of Cancer* 82:1459–1468
185. Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL (2010) An update on androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 17:R305–R315
186. Shekhar MPV, Santner S, Carolin KA, Tait L (2007) Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *The American Journal Of Pathology* 170:1546–1560
187. Shekhar MPV (2011) Drug resistance: challenges to effective therapy. *Current Cancer Drug Targets* 11:613–623
188. Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* (New York, NY) 306:990–995
189. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Graham R, Russell G, Croucher PI (1998) Anti-tumour activity of bisphosphonates in human myeloma cells. *Leukemia & Lymphoma* 32:129–138
190. Shmeeda H, Amitay Y, Tzemach D, Gorin J, Gabizon A (2013) Liposome encapsulation of zoledronic acid results in major changes in tissue distribution and increase in toxicity. *Journal Of Controlled Release: Official Journal Of The Controlled Release Society* 167:265–275
191. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F (2001) The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of human osteosarcoma cell growth in vitro. *Anti-Cancer Drugs* 12:459–465

192. Sprenger CCT, Plymate SR (2014) The link between androgen receptor splice variants and castration-resistant prostate cancer. *Hormones & Cancer* 5:207–217
193. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC (1990) Family history and the risk of prostate cancer. *The Prostate* 17:337–347
194. Stern ST, McNeil SE (2008) Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicological Sciences: An Official Journal Of The Society Of Toxicology* 101:4–21
195. Stöckle M, Bussar-Maatz R (2012) [Localised prostate cancer: the PREFERE trial]. *Zeitschrift Für Evidenz, Fortbildung Und Qualität Im Gesundheitswesen* 106:333–335
196. Stresing V, Daubiné F, Benzaid I, Mönkkönen H, Clézardin P (2007) Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Letters* 257:16–35
197. Takagi A, Watanabe M, Ishii Y, Morita J, Hirokawa Y, Matsuzaki T, Shiraishi T (2007) Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features. *Anticancer Research* 27:45–53
198. Tannock I (1976) Oxygen distribution in tumours: influence on cell proliferation and implications for tumour therapy. *Advances In Experimental Medicine And Biology* 75:597–603
199. Tao Z-Q, Shi A-M, Wang K-X, Zhang W-D (2015) Epidemiology of prostate cancer: current status. *European Review For Medical And Pharmacological Sciences* 19:805–812
200. Thorley AJ, Tetley TD (2013) New perspectives in nanomedicine. *Pharmacology & Therapeutics* 140:176–185
201. Torisawa Y-S, Takagi A, Shiku H, Yasukawa T, Matsue T (2005) A multicellular spheroid-based drug sensitivity test by scanning electrochemical microscopy. *Oncology Reports* 13:1107–1112
202. Tourville EA, Nguyen MM (2013) Prostate cancer detection by using digital rectal examination: contemporary practice patterns in the United States. *Clinical Genitourinary Cancer* 11:263–269
203. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat J, Smith-Jones

- PM, Yoo D, Kwon A, Wasielewska T, Welsbie D, Chen CD, Higano CS, Beer TM, Hung DT, Scher HI, Jung ME, Sawyers CL (2009) Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science (New York, NY)* 324:787–790
204. Tung Y-C, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa Y, Ho M, Takayama S (2011) High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst* 136:473–478
 205. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR (2002) Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Research* 62:3298–3307
 206. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR (2002) Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Research* 62:6021–6025
 207. Venkatasubramanian R, Henson MA, Forbes NS (2006) Incorporating energy metabolism into a growth model of multicellular tumor spheroids. *Journal Of Theoretical Biology* 242:440–453
 208. Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T (2012) Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Molecular And Cellular Endocrinology* 360:38–43
 209. Wang H, Huang S, Shou J, Su EW, Onyia JE, Liao B, Li S (2006) Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data. *BMC Genomics* 7:166–166
 210. Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1981) Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *The Prostate* 2:89–96
 211. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, Kim K, Sawyers CL (2010) Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 107:16759–16765

212. Wenzler DL, Rosenberg BH (2014) Urologists' personal feelings on PSA screening and prostate cancer treatment. *Journal Of Evaluation In Clinical Practice* 20:408–410
213. Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, Dupressoir T, Seitz G, Vandenbunder B, Stéhelin D (1994) Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Research* 54:5683–5688
214. Wernert N (1997) The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Archiv: An International Journal Of Pathology* 430:433–443
215. De Wever O, Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *The Journal Of Pathology* 200:429–447
216. Wibe E (1980) Resistance to vincristine of human cells grown as multicellular spheroids. *British Journal Of Cancer* 42:937–941
217. Wiegel T, Albers P, Bussar-Maatz R, Gottberg A, Härter M, Kieser M, Kristiansen G, Nettekoven G, Martus P, Schmidberger H, Wellek S, Stöckle M (2013) [PREFERE - the German prostatic cancer study: questions and claims surrounding study initiation in January 2013]. *Der Urologe Ausg A* 52:576–579
218. Wittekind C, International Union against Cancer (2012) TNM: Klassifikation maligner Tumoren, 7. Aufl., 4., korr. Nachdr. Wiley-Blackwell, Weinheim
219. Wlodkowic D, Darzynkiewicz Z (2011) Rise of the micromachines: microfluidics and the future of cytometry. *Methods In Cell Biology* 102:105–125
220. Woolf CM (1960) An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. *Cancer* 13:739–744
221. Yadav SS, Li J, Lavery HJ, Yadav KK, Tewari AK (2015) Next-generation sequencing technology in prostate cancer diagnosis, prognosis, and personalized treatment. *Urologic Oncology* 33:267.e1–267.e13
222. Ying X, Wen H, Lu W-L, Du J, Guo J, Tian W, Men Y, Zhang Y, Li R-J, Yang T-Y, Shang D-W, Lou J-N, Zhang L-R, Zhang Q (2010) Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Journal Of Controlled Release: Official Journal Of The Controlled Release Society* 141:183–192

223. Yip D, Cho CH (2013) A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 433:327–332
224. Zamboni WC (2005) Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 11:8230–8234
225. Zamboni WC, Torchilin V, Patri AK, Hrkach J, Stern S, Lee R, Nel A, Panaro NJ, Grodzinski P (2012) Best practices in cancer nanotechnology: perspective from NCI nanotechnology alliance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 18:3229–3241
226. Zhuang Z-Y, Gerner P, Woolf CJ, Ji R-R (2005) ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 114:149–159
227. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 3.1, (2014) AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>

7. Publikationen/Dank

7.1 Publikationen

1. Ohlmann C, Schmidt J, Kamradt J, Stoeckle M, Salzano G, Junker K, Caraglia M, Rosa GD, Unteregger G (2012) Abstract 5231: Zoledronic acid encapsulated into liposomes and nanoparticles: Enhanced antitumor activity in 3D-prostate carcinoma spheroids. *Cancer Research* 72:5231–5231
2. Schmidt J, Kamradt J, Stöckle M, Derosa G, Lombardi A, Caraglia M, Unteregger G (2013) 828 Antitumor activity of nanovectors encapsulating zoledronic acid (ZOL) in 3D prostate carcinoma spheroids. *European Urology Supplements* 12:e828
3. Schmidt J, De Rosa G, Kamradt J, Junker K, Stoeckle M, Caraglia M, Unteregger G (2013) 1320 Zoledronic acid (ZOL) encapsulated into liposomes and nanoparticles: enhanced antitumor activity in 3D-Prostate carcinoma spheroids. *The Journal of Urology* 189:e539–e540
4. Schmidt J, De Rosa G, Lombardi A, Kamradt J, Stöckle M, Caraglia M, Unteregger G (2012) Zoledronic Acid (ZOL) encapsulated into liposomes and nanoparticles. Enhanced antitumor activity in 3D-prostate carcinoma spheroids. *Der Urologe* 51 [Suppl 1]:102
5. Schmidt J, De Rosa G, Lombardi A, Kamradt J, Stoeckle M, Caraglia M, Unteregger G (2013) Zoledronic Acid (ZOL) encapsulated into liposomes and nanoparticles. Enhanced antitumor activity in 3D-prostate carcinoma spheroids. *Der Urologe Ausg A* 52:104

7.2 Posterpräsentationen und Vorträge

1. Vortrag und Posterpräsentation 3. Symposium Tumor-Microenvironment: Bedeutung für Tumorbilogie und Klinik, Jena 8. – 9. Juni 2012
Ohlmann CH, Schmidt J, De Rosa G, Salzano G, Kamradt J, Stöckle M, Junker K, Luca A, Caraglia M, Unteregger G Zoledronic acid (ZOL) encapsulated into liposomes and nanoparticles: enhanced antitumor activity in 3D-Prostate carcinoma spheroids
2. Posterpräsentation 20th Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR) 25 – 27 October 2012, Strasbourg, France

Schmidt J, De Rosa G, Lombardi A, Kamradt J, Stöckle M, Caraglia MC, Unteregger G
Zoledronic acid (ZOL) encapsulated into liposomes and nanoparticles: enhanced
antitumor activity in 3D-Prostate carcinoma spheroids

3. Posterpräsentation 54. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie
e.V. Baden-Baden 13.06 – 15. 06. 2013

Schmidt J, De Rosa G, Ohlmann C, Stöckle M, Caraglia M, Unteregger G Die Wirkung
Nano-und Liposomal-verkapselter Zoledronsäure (NP-ZOL und LP-ZOL) auf
Prostatakarzinomzellen in 3D-Spheroidkulturen

7.3 Dank

An dieser Stelle darf ich mich bei all den Personen bedanken, ohne deren tatkräftige Hilfe und moralische Unterstützung diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Dabei möchte ich zunächst all den Freunden, Kommilitonen, wissenschaftlichen Mitarbeitern und Familienmitgliedern danken, die im Folgenden nicht namentlich erwähnt werden. Ihr wart immer für mich da, um mir über Enttäuschungen hinwegzuhelfen und euer Glaube an mich gab mir die Kraft, durchzuhalten.

Ferner bin ich Prof. Dr. Gerhard Unteregger für die Zusammenarbeit und Betreuung während der experimentellen Phase der Doktorarbeit zu Dank verpflichtet. Durch Sie erhielt ich einen aufschlussreichen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten. Insbesondere Ihr unermüdliches Engagement, welches mir die Teilnahme an einer Vielzahl von Kongressen ermöglichte, wusste ich sehr zu schätzen.

Weiterhin danke ich den italienischen Kooperationspartnern der Universität von Neapel für das Überlassen der freien Zoledronsäure sowie die Bereitstellung der einzelnen Komponenten und des Protokolls zur Herstellung der entsprechenden Zoledronsäuremodifikationen.

Während meiner Arbeit im urologischen Zellkulturlabor standen mir sämtliche wissenschaftliche Mitarbeiter immer mit Rat und Tat zur Seite. Hierbei möchte ich insbesondere Frau Maria Link und Frau Helga Angeli danken. Dank eurer fachlichen Kompetenz und eurer unendlichen Geduld, mit der ihr mir jederzeit geholfen habt, erlangte ich die Fähigkeit, die wissenschaftlichen Fragestellungen meiner Experimente selbstständig zu bearbeiten. Für euren nicht selbstverständlichen Einsatz möchte ich mich ganz besonders bedanken. Die Zusammenarbeit mit euch habe ich sehr genossen.

Unter meinen Kommilitonen muss ich ausdrücklich Frau Simone Ernst danken. Simone, du warst während des gesamten Studiums eine große Stütze, vor allem aber warst du meine Verbündete während der Datenerhebung im Forschungslabor der Urologie. Der Austausch mit dir und deine Anwesenheit im Labor hat vieles einfacher gemacht. Für deine Unterstützung bin ich dir sehr dankbar. Gleichzeitig möchte ich hier deinem unerschrockenen Einsatz als meine private Chauffeuse Tribut zollen.

Zu den Personen, die sich im Rahmen dieser Arbeit besonders verdient gemacht haben, gehört unter anderem meine Großmutter, die mit Sturzgebeten und unter Mobilisierung des Heiligen Antonius, der Heiligen Oranna und sämtlicher Heiligen für Gottes Beistand gesorgt hat. Im Zuge dessen hat sie durch das tägliche Anzünden von Kerzen und Teelichtern für den wirtschaftlichen Aufschwung der Kerzen-Industrie gesorgt. Oma Olli, du hast mir immer positive Gedanken und Energie geschickt und somit zusammen mit deiner Liebe und Zuneigung einen immensen Beitrag zu Fertigstellung meiner Dissertation geleistet.

Nicht genug danken kann ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker für die ausgezeichnete, stetige und umfassende Betreuung während des Verfassens der Dissertationsschrift. Ohne Ihre konstruktive, zeitnahe und kompetente Unterstützung wäre ich nicht in der Lage gewesen, die vorliegende Arbeit zu schreiben.

Zuletzt möchte ich der Frau danken, ohne die ich nicht hier wäre, meiner Mutter. Mama, du hast mich mein ganzes Leben lang kompromiss-, grenzen- und bedingungslos geliebt und gabst mir die Kraft, über mich hinauszuwachsen. Ich danke Gott dafür, dass ich eine so wundervolle Mutter habe und bin mehr als auf alles andere stolz darauf, dein Sohn zu sein.